



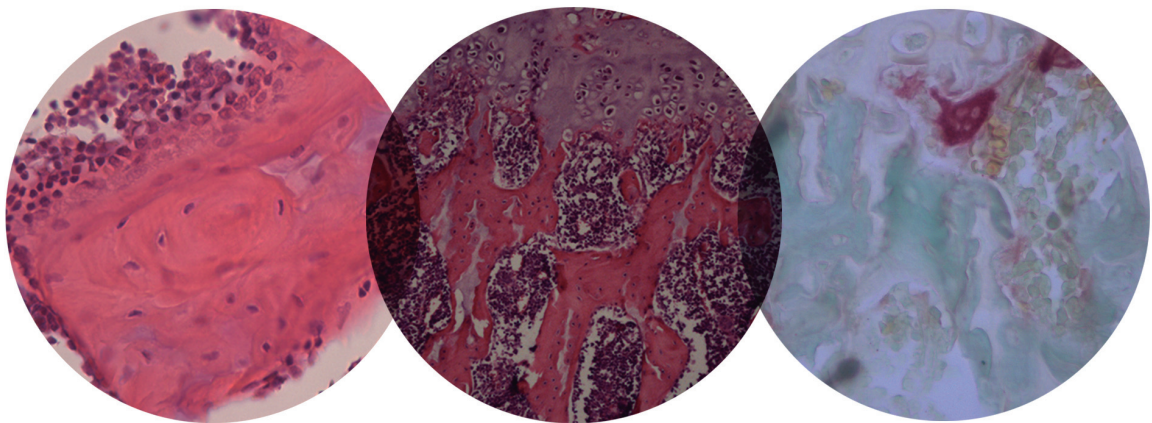
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

*EFFECTO DE DROGAS ANTIDIABÉTICAS SOBRE LA DIFERENCIACIÓN
DE CÉLULAS PROGENITORAS DE MÉDULA ÓSEA Y LA
MICROARQUITECTURA DE TEJIDO ÓSEO DE RATA.*



María José Anahí Tolosa

Ana María Cortizo ~ María Silvina Molinuevo

2013
.....

El presente trabajo de tesis ha sido desarrollado para acceder al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas bajo la dirección de la Dra. Ana María Cortizo y la codirección de la Dra. María Silvana Molinuevo.

El mismo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Osteopatías y Metabolismo Mineral (LIOMM) de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, y fue posible gracias a la beca doctoral otorgada por la Comisión de Investigaciones Científicas de La Provincia de Buenos Aires (CIC-PBA).

A Petete

A mis Padres

A Juani

Agradecimientos

Ninguna de estas palabras es suficiente para demostrar lo profundamente agradecida y acompañada que he estado durante este período de aprendizaje.

Primero quiero agradecer a mis Padres por enseñarme a disfrutar de estudiar, a hacer las cosas con el máximo esfuerzo y dedicación, siempre recordando que con respeto, compañerismo y amor, todo es mejor.

A mis tías Petete, Hongo y a mi tío José Luis, porque han sido fundamentales en todas mis etapas de aprendizaje y porque también con su forma de ser me enseñaron la pasión y vocación docente. A mis primos Federica, Federico y Viviana por ser mis hermanos mayores. A Walter porque me enseñó lo que es tener un hermanito menor ocurrente e inteligente. A la familia Felice-Blancá: María Clara, Juan, Flor, Walter; quienes también cuidan y preocupan por mí.

A mis directoras Ana y Silvina por darme la posibilidad de hacer esta tesis, brindándome el lugar y su tiempo para enseñarme y corregirme durante estos años, y por siempre intentar, junto con Antonio, darnos mejores condiciones de trabajo.

A mis compañeros y amigos del LIOMM, porque son mi familia laboral, gracias a Vir, Vero, Juani, Juanma, Malala, Sarita, Laurita, Gimena y a las más nuevas: Flor que siempre nos ayuda, Flavia y Ana. No creo que exista otro grupo tan compañero, libre de competencia y envidia. Estas cualidades del grupo también se las agradezco a los fundadores del LIOMM: Ana, Sil y Antonio. A Claudia, León y Química Montpellier por brindarme la metformina y rosiglitazona.

A las cátedras que me han dado la posibilidad de iniciarme y continuar en la docencia; los profesores: Gustavo Rinaldi, Alejandro Rebolledo, Verónica Milesi, Alicia Gómez Alvis y Pablo Mobili; cada uno de ellos me han enseñado distintos aspectos y funciones docentes. A mis ex compañeros y compañeros de cátedra: Silvia, Belén, Romina, Nicolás, Vanina, Rocío, Eugenia, Nicolás, Matías y Melisa.

A mis amigas: Luz, Piti, Flor, Vivi, Marinita, Puli, Pauli. A mis amigas de Puebla: Vero, Manu y Jose (quien diseñó la portada de la tesis). A mis amigos los músicos que se preocupaban por la salud de las ratas de laboratorio: Edu, Pablo, Gastón, Walter, Irene, Flor y

Carolina. A mis amigas las biotecnólogas: Guille, Lau y Ro. A los amigos de la UNLP: Francisco, Luciana y Susana.

Por último, a Juani mi compañero del alma, que me apuntala con paciencia, perseverancia y amor. Juntos hemos crecido durante este doctorado tanto en lo profesional como en el personal.

¡GRACIAS A TODOS!

Índice

Introducción	2
I. 1. Tejido óseo	2
I. 1. 1. Función y estructura ósea	2
I. 1. 2. Clasificación del tejido óseo	4
I. 1. 2. A. Tejido óseo cortical o compacto	4
I. 1. 2. B. Tejido óseo trabecular o esponjoso	5
I. 1. 3. Tipos celulares presentes en el hueso	6
I. 1. 3. A. Células progenitoras de médula ósea.	6
I. 1. 3. B. Células osteoprogenitoras.	8
I. 1. 3. C. Osteoblastos	8
I. 1. 3. D. Osteocitos	9
I. 1. 3. E. Osteoclastos	10
I. 1. 3. F. Células de revestimiento óseo	11
I. 1. 4. A. Mineralización ósea	12
I. 1. 4. B. Crecimiento, modelado y remodelado óseo	12
I. 1. 5. Factores de transcripción implicados en la diferenciación de CPMO.	15
I. 1. 5. A. Diferenciación osteoblástica	15
I. 1. 5. B. Diferenciación adipocítica	15
I. 2. 1. Diabetes	17
I. 2.1. Clasificación de la Diabetes mellitus	17
I. 2. 1. A. Diabetes mellitus tipo 1	17
I. 2. 1. B. Diabetes mellitus tipo 2	18
I. 2. 2. Complicaciones de la Diabetes	19
I. 2. 2. A. Complicaciones Agudas	19
I. 2. 2. B. Complicaciones Crónicas	19
I. 2. 3. Mecanismos de patogenicidad de la diabetes	20
I. 2. 3. A. Productos de glicación avanzada - AGEs	21
I. 2. 3. B. Interacción entre AGE y su receptor (RAGE)	22
I. 2. 4. Diabetes Mellitus y hueso	22
I. 2. 4. A. Densidad mineral ósea y diabetes mellitus tipo 1	23
I. 2. 4. B. Densidad mineral ósea y diabetes mellitus tipo 2	24

I. 2. 4. C. Patofisiología del mayor riesgo de fracturas en la Diabetes mellitus	24
I. 2. 5. Tratamiento de la Diabetes mellitus tipo 2	26
I. 2. 5. A. Metformina	26
I. 2. 5. B. Tiazolidinedionas	28
I. 2. 6. Modelos animales utilizados para el estudio de Diabetes mellitus tipo 2	30
I. 2. 6. A. Modelos espontáneos:	31
I. 2. 6. B. Modelos inducidos	32
I. 2. 6. C. Modelo de diabetes inducida por STZ-NA	33
Objetivos	37
Materiales y métodos	39
II. 1. Estudios <i>in vitro</i>	39
II. 1. 1. Obtención de CPMO.	39
II. 1. 2. Diferenciación osteoblástica de CPMO.	40
II. 1. 2. A. Determinación de parámetros de diferenciación osteoblástica.	40
II. 1. 3. Diferenciación adipogénica de CPMO.	41
II. 1. 3. A. Determinación de parámetros de diferenciación adipocítica.	42
II. 1. 4. Determinación de los niveles de expresión de proteínas por Western blot.	42
II. 2. Estudios <i>in vivo</i>	44
II. 2. 1. Animales y tratamientos.	44
II. 2. 1. A. Experimento I: Efecto de los agentes antidiabéticos.	44
II. 2. 1. B. Experimento II: Efecto de la Metformina en un modelo de Diabetes	45
II. 3. Análisis Histomorfométrico.	48
II. 3. A. Obtención de las muestras para histomorfometría del hueso	48
a) Tinción con Hematoxilina - Eosina	48
b) Tinción histoquímica para fosfatasa ácida tartratoresistente (TRAP).	49
c) Tinción de Azul Alcian pH 2.5.	50
II. 3. B. Histomorfometría ósea	50
II. 4. Análisis estadístico	51
Diseño experimental	52
Resultados	54
III. 1. 1. Estudios <i>in vitro</i>	54

III. 1. Efecto de la metformina sobre la diferenciación de células progenitoras de médula ósea.	54
Efecto directo de la metformina sobre la diferenciación osteoblástica.	
III. 1. 2. Estudios <i>ex vivo</i>	56
III. 1. 2. A. Efecto de la administración <i>in vivo</i> de metformina sobre la capacidad <i>ex vivo</i> de diferenciación osteoblástica de las CPMO.	56
III. 1. 2. B. Efecto del tratamiento con metformina sobre factores de transcripción osteoblásticos y adipogénicos.	58
III. 1. 2. C. Efecto de la metformina sobre la activación de la AMPK en las CPMO.	60
III. 2. Efectos de la rosiglitazona y del co-tratamiento rosiglitazona-metformina.	65
III. 2. 1. Estudios <i>in vitro</i> .	65
Efectos de la rosiglitazona y del co-tratamiento rosiglitazona-metformina en la diferenciación adipocítica.	65
III. 2. 2. Estudios <i>ex vivo</i> .	66
III. 2. 2. A. Efectos de la rosiglitazona y del co-tratamiento con metformina sobre la capacidad osteogénica de CPMO.	66
III. 2. 2. B. Efectos de la rosiglitazona y del co-tratamiento rosiglitazona-metformina sobre la expresión de factores de transcripción osteoblásticos y adipocíticos.	68
III. 2. 2. C. Efectos de la rosiglitazona y del co-tratamiento rosiglitazona-metformina sobre la activación de la AMPK en CPMO.	71
III. 2. 3. Estudios <i>in vivo</i> .	72
Efectos de la metformina, la rosiglitazona y su co-tratamiento sobre la microarquitectura femoral	72
III. 3. Efectos del tratamiento oral con metformina en un modelo de diabetes deficiente en insulina sobre el metabolismo óseo.	76
Evaluación del modelo animal de estudio	76
III. 3. 1. Estudios <i>ex vivo</i> .	77
III. 3. 1. A. Efectos sobre la diferenciación osteoblástica.	77
III. 3. 1. B. Expresión de factores de diferenciación osteoblásticos y adipogénicos.	79

III. 3. 1. C. Efectos sobre la expresión del RAGE en CPMO	81
III. 3. 2. Estudios <i>in vivo</i>.	83
Efectos sobre la microarquitectura ósea femoral.	83
Discusión	87
Conclusiones	98
Bibliografía	100

INTRODUCCIÓN



I.1. Tejido Óseo

I. 1. 1. Función y estructura ósea

El sistema esquelético está constituido por dos partes fundamentales: una ósea, formada por los huesos, que constituyen la estructura sólida; y una cartilaginosa y membranosa, que forma la parte más blanda [Llusá., 2006]. Los huesos son órganos formados por la asociación de diferentes tejidos siendo el tejido óseo el componente mayoritario. El tejido óseo es un tejido complejo y dinámico que experimenta continuamente un proceso llamado remodelación (Sección I.1.4.B) que implica la destrucción del tejido óseo viejo y construcción simultánea de tejido óseo nuevo [Tortora, 2011].

El esqueleto cumple varias funciones. Los huesos del esqueleto proveen soporte estructural al resto del cuerpo; permiten el movimiento y locomoción al permitir la inserción de músculos; protegen órganos y estructuras vitales; participan en el mantenimiento de la homeostasis del metabolismo mineral y del balance ácido-base; sirven como reservorio de factores de crecimiento y citoquinas; y proveen el entorno adecuado para la hematopoyesis en

los espacios donde se aloja la médula ósea [Clarke, 2008].

Los huesos se pueden clasificar según su geometría en *huesos largos* como el fémur, la tibia y el húmero, *huesos planos* como los del cráneo y la mandíbula, *huesos cortos* como los huesos del carpo y del tarso, y *huesos irregulares* como las vértebras [Testut, 1983; Clarke, 2008].

Un hueso largo típico consta de un cuerpo y dos extremos. El cuerpo, o **diáfisis**, generalmente es prismático y triangular, y los extremos o **epífisis** son más voluminosos (Figura I.1.1.1). Las zonas que participan en la articulación con algún otro hueso están recubiertas por una capa fina de **cartilago hialino articular**, cuya función es reducir la fricción y absorber parcialmente los impactos en las articulaciones. Las superficies externas que no están recubiertas por este cartilago están

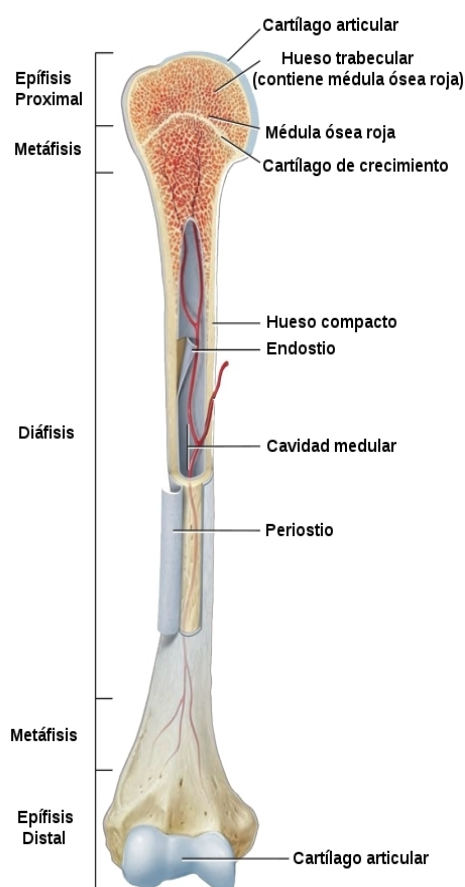


Figura I.1.1.1 Esquema de la estructura general de un hueso largo. (Tomado del libro “Principios de Anatomía y Fisiología”, Tortora)

recubiertas por el periostio.

En los huesos largos maduros existe una región con forma de cono denominada **metáfisis** que comunica la diáfisis con cada epífisis. En un hueso en crecimiento, esta región contiene a la placa epifisaria o **cartílago de crecimiento**, capa de cartílago hialino que permite a la diáfisis crecer en longitud. Cuando un hueso deja de crecer en longitud, este cartílago es reemplazado por tejido óseo y la estructura resultante se conoce como **línea epifisaria**. La **cavidad medular** es el espacio dentro de la diáfisis que en los adultos contiene médula ósea.

El tejido óseo es una forma especializada de tejido conectivo denso. La matriz ósea extracelular se compone de una matriz orgánica y de sales inorgánicas. La matriz orgánica está formada por fibras de colágeno tipo I en un 90%; mientras que los componentes inorgánicos están compuestos en su mayor parte por depósitos de fosfato de calcio cristalino, casi idénticos a los del mineral hidroxiapatita, con fórmula general $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Los cristales se disponen en paralelo, en relación estrecha con las fibras de colágeno [Geneser, 2006].

En la matriz ósea también se encuentran proteínas no colágenas como:

- Macromoléculas de proteoglicanos que contribuyen a que el tejido óseo ofrezca resistencia a la compresión.
- Glucoproteínas multiadhesivas que actúan en la adhesión de las células óseas y las fibras colágenas a la matriz mineralizada. Por ejemplo: *osteonectina* (que sirve como adhesivo entre colágeno y los cristales de hidroxiapatita), sialoproteínas como la *osteopontina* (que media la adhesión de las células a la matriz ósea) y las *sialoproteínas I y II* (que median la adhesión celular e inician la formación de fosfato de calcio durante el proceso de mineralización).
- Proteínas dependientes de la vitamina K osteoespecíficas que incluyen a la *osteocalcina*, que captura el calcio desde la circulación atrayendo y estimulando los osteoclastos en el remodelado óseo.
- Factores de crecimiento y citoquinas que son proteínas reguladoras pequeñas entre las que se encuentran los *factores de crecimiento insulino similares (IGF)*, el *factor de necrosis tumoral α (TNF- α)*, el *factor transformante de crecimiento β (TGF- β)*, los *factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF)*, las *proteínas morfogénicas óseas (BMP)* y las *interleuquinas (IL-1, IL-6)*.

La superficie externa del hueso está recubierta por una capa de tejido conectivo denso llamada **periostio** (excepto en las regiones donde se ubica el cartílago articular). Contiene vasos sanguíneos, fibras nerviosas, osteoblastos y osteoclastos. El periostio está unido firmemente a la

superficie cortical externa del hueso por fibras colágenas gruesas. La actividad del periostio es importante para el crecimiento aposicional del hueso y la reparación de fracturas [Clarke, 2008].

El **endostio** es una estructura membranosa que cubre la superficie interior del hueso cortical, hueso trabecular, y los canales de los vasos sanguíneos (de Havers y de Volkmann) presentes en el hueso. Contiene vasos sanguíneos, osteoblastos y osteoclastos [Clarke, 2008].

I. 1. 2. Clasificación del tejido óseo

El esqueleto adulto humano está compuesto en un 80% por hueso cortical y en un 20% por hueso trabecular. La proporción de hueso cortical y hueso trabecular varía dependiendo del tipo de hueso y de las diferentes zonas dentro de un mismo hueso [Clarke, 2008].

I. 1. 2. A. Tejido óseo cortical o compacto

El tejido óseo compacto no contiene cavidades, es el componente más resistente del hueso, se encuentra siempre en la parte externa, y forma la mayor parte de la diáfisis de los huesos largos. Sus funciones son proporcionar protección y soporte, ofreciendo resistencia a la tensión causada por el peso y el movimiento. Este tejido está compuesto principalmente por unidades cilíndricas llamadas **osteonas** o sistemas de Havers (Figura I.1.2.A.1). Las osteonas consisten en laminillas concéntricas de matriz ósea mineralizada alrededor de un conducto central, el conducto de Havers, que contiene vasos y nervios. Los osteocitos se ubican en pequeños espacios alargados excavados en las laminillas llamados lagunas. Estas células poseen numerosas prolongaciones finas que discurren por canales estrechos llamados canalículos que en general se disponen siguiendo un patrón radial con respecto al conducto. El sistema de canalículos se abre en el conducto de Havers y sirve para el intercambio de sustancias entre los osteocitos y los vasos sanguíneos. Entre las osteonas hay restos de laminillas antiguas que reciben el nombre de laminillas intersticiales. El eje longitudinal de las osteonas es paralelo al eje mayor del hueso. Otros sistemas de canales conductores de vasos, los conductos de Volkmann, comunican los conductos de Havers entre sí y con las superficies externa (periostio) e interna (endostio) del hueso.

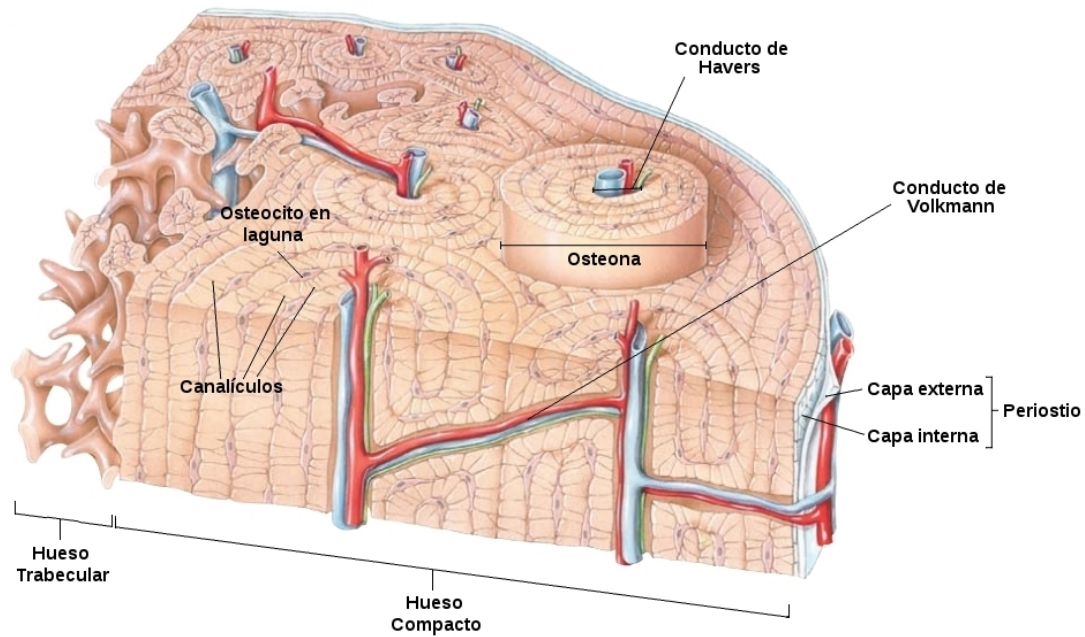


Figura I.1.2.A.1 Esquema de la estructura del hueso cortical (Adaptado del libro “Principios de Anatomía y Fisiología”, Tortora).

I. 1. 2. B. Tejido óseo trabecular o esponjoso.

Este tipo de hueso recibe su nombre por su aspecto. Siempre se encuentra localizado en el interior del hueso, protegido por una capa de hueso compacto. Constituye la mayor parte los huesos cortos, planos, e irregulares. Integra muchas de las epífisis de los huesos largos y también se ubica alrededor de la cavidad medular de la diáfisis de los mismos huesos. Al contrario de lo observado en el hueso compacto, este tejido no contiene osteonas. El hueso esponjoso tiene laminillas dispuestas en una red irregular de columnas delgadas que se denominan **trabéculas** (*trabéculas* = pequeños rayos). Los espacios macroscópicos entre las trabéculas hacen más livianos a los huesos y pueden a veces llenarse con médula ósea roja (huesos de la cadera, costillas, esternón, vértebras y epífisis de los huesos largos). Allí es donde se produce la hematopoyesis en los adultos. Dentro de cada trabécula hay lagunas que contienen osteocitos. Los canalículos se irradian hacia fuera desde las lagunas. La nutrición de estas células se produce por difusión desde la superficie cubierta por endostio a través de los canalículos comunicantes (Figura I.1.2.B.1).

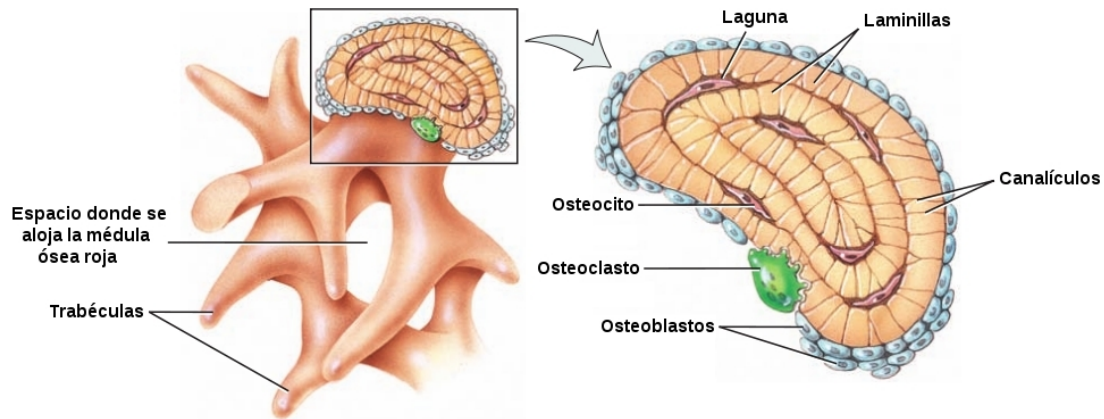


Figura I.1.2.B.1. Esquema de la estructura del hueso trabecular (Adaptado del libro “Principios de Anatomía y Fisiología”, Tortora).

I. 1. 3. Tipos celulares presentes en el hueso

A continuación, se describirán las células que forman parte del tejido óseo así como un tipo celular de la médula ósea que se aloja en algunos huesos. Existen cuatro tipos celulares en el tejido óseo: osteoblastos, osteocitos, células del revestimiento óseo y osteoclastos. Las primeras tres derivan de un precursor común llamado célula progenitora y cada una se transforma de una forma inmadura en una forma más madura en relación con la actividad funcional (crecimiento óseo). Los osteoclastos tienen su origen en una línea celular diferente y actúan en la resorción ósea, una actividad relacionada con el remodelado de los huesos [Ross, 2007].

I. 1. 3. A. Células progenitoras de médula ósea.

Se conoce con el nombre de células progenitoras a un grupo específico de células indiferenciadas que tienen un potencial proliferativo elevado y que presentan dos características fundamentales: la habilidad de autorrenovarse, es decir de formar células idénticas a las células originales; y la capacidad de generar uno o más tipos celulares que desempeñan funciones especializadas en el organismo [Flores-Figueroa, 2006].

La potencialidad de estas células puede describirse con un modelo jerárquico (Figura I.1.3.A.1). El oocito fertilizado o cigoto se compone de células totipotenciales por que tienen la habilidad de formar todos los tejidos, tanto del embrión como de la placenta. Esto las ubica en la base de la pirámide. Las células progenitoras embrionarias son pluripotenciales, ya que pueden

diferenciarse a casi cualquier tipo de célula de las tres capas germinales. Luego se encuentran células multipotenciales como las células progenitoras de médula ósea (CPMO) y las células progenitoras derivadas de tejido adiposo, las cuales son capaces de diferenciarse a varios linajes como cartílago, hueso, músculo y tejido adiposo (Figura I.1.3.A. 2). En el vértice de este modelo encontramos a las células unipotenciales que solo son capaces de producir su propio tipo celular [Spencer, 2011].

En los últimos años, ha crecido notablemente el interés en las células progenitoras obtenidas de diferentes tejidos generalmente desechados, como placenta o sangre de cordón umbilical, ya que además de tener interés biológico no acarrear problemas éticos como las células progenitoras embrionarias. En la actualidad, el estudio de las células progenitoras ha estado enfocado tanto a la generación de conocimientos básicos sobre su biología, como a su manipulación *in vitro* para su posible aplicación clínica.

En la médula ósea se encuentran dos grupos de células progenitoras: las CPMO y las células progenitoras hematopoyéticas. Estas últimas han sido las más estudiadas (desde los años '50), y en la actualidad se tiene un panorama bastante claro de su estructura y biología. El estudio de las células progenitoras mesenquimáticas comenzó en la década del '70 y estuvo enfocado principalmente al conocimiento de su papel en la formación del estroma hematopoyético.

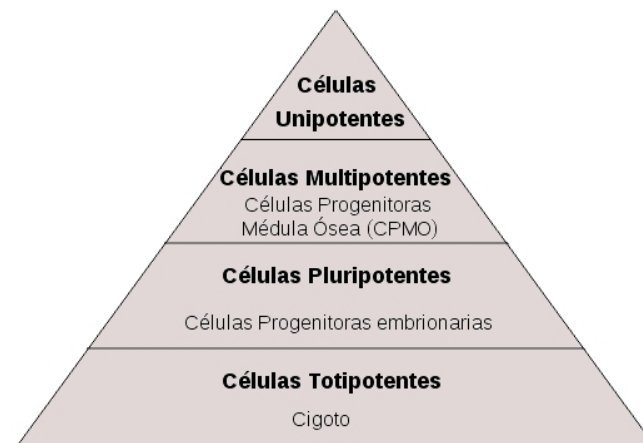


Figura I.1.3.A.1. Esquema jerárquico de la potencialidad de las células progenitoras. [Traducido de Spencer, 2011]

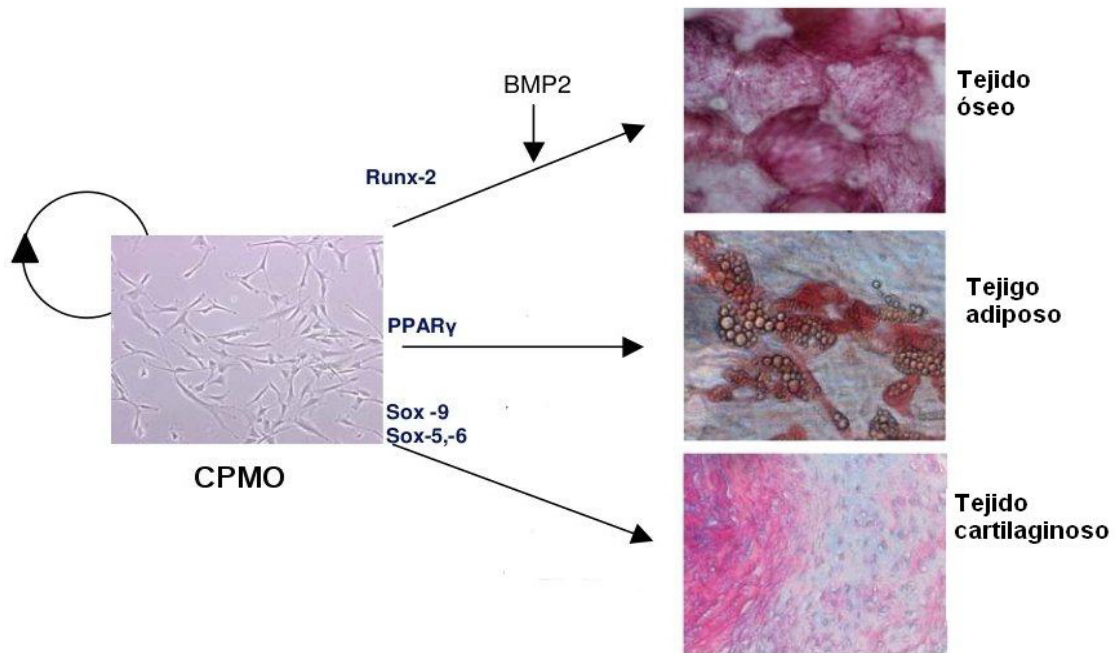


Figura I.1.3.A.2. Tejidos que pueden surgir a partir de CPMO [Adaptado de Oreffo, 2005].

I. 1. 3. B Células osteoprogenitoras.

Las células osteoprogenitoras derivan de las células progenitoras mesenquimáticas pluripotentes de médula ósea. Son parecidas a los fibroblastos, dado que poseen núcleos ovoides claros y citoplasma claro con límites irregulares. Durante la formación del tejido óseo estas células se dividen y diferencian a osteoblastos. Esto ocurre sobre todo durante la vida fetal y la etapa de crecimiento, pero en la edad adulta se pueden observar en relación con la reparación de fracturas [Geneser, 2006].

I. 1. 3. C. Osteoblastos

Los osteoblastos son las células formadoras de hueso; es decir, sintetizan y secretan matriz ósea orgánica (fibras de colágeno, proteoglicanos y moléculas pequeñas como osteocalcina, osteonectina, etc.). El osteoblasto también tiene a su cargo la mineralización de la matriz [Geneser, 2006]. Al microscopio óptico, los osteoblastos se reconocen por su forma cuboide o poliédrica y su distribución monoestratificada en la superficie donde se está formando el tejido óseo; el citoplasma contiene gran cantidad de fosfatasa alcalina, demostrable por métodos histoquímicos, la cual tiene importancia en el proceso de mineralización.

Los osteoblastos responden a estímulos mecánicos (entre otros) para mediar los cambios en el crecimiento y remodelado de los huesos. A medida que se deposita la matriz orgánica, el osteoblasto va quedando rodeado por ella; cuando queda incluido por completo dentro de la matriz mineralizada, puede morir por apoptosis o convertirse en un osteocito. Otro posible destino para el osteoblasto es convertirse en célula de revestimiento. Los osteoblastos también regulan la diferenciación y actividad de los osteoclastos. Así, los osteoblastos junto con los osteoclastos, juegan un papel importante en el recambio óseo y en la homeostasis del calcio [Tortora, 2011].

I. 1. 3. D. Osteocitos

Los osteocitos componen entre el 90 y 95% de todas las células en el hueso adulto y son las células de vida media más larga en el hueso [Dallas, 2010]. Como se vio antes, estas células se originan a partir de osteoblastos que quedan atrapados dentro de las lagunas en la matriz ósea recién sintetizada durante el proceso de formación de hueso. Los osteocitos emiten finas prolongaciones citoplasmáticas a través de los canaliculos que les permite comunicarse entre sí, con los osteoblastos y las células de revestimiento. Normalmente no expresan fosfatasa alcalina pero sí expresan osteocalcina, galectina-3, CD44 y el receptor de hialuronato; así como también, otras proteínas de matriz ósea. Estas células son capaces de resorber la matriz adyacente a la laguna en un proceso denominado osteólisis osteocítica, y así participar en la regulación del metabolismo fosfocálcico, mecanismo regulado por la secreción de hormona paratiroidea (PTH).

Es posible que los osteocitos desempeñen un papel importante en la comunicación del estado del tejido óseo hacia la superficie, hacia las células de recubrimiento óseo y también hacia los osteoclastos. Tienen la capacidad para registrar diferencias de potencial que se generan en relación con la deformación mecánica del hueso y, en consecuencia, es posible que intervengan en el mantenimiento de la calidad del tejido óseo mediante señales que emiten hacia la superficie que pueden facilitar su remodelamiento [Geneser, 2006].

Los osteocitos pueden vivir por décadas. La presencia de una laguna vacía en un hueso envejecido sugiere que el osteocito entró en apoptosis, probablemente causado por la interrupción de las uniones estrechas o de las interacciones célula matriz.

I. 1. 3. E. Osteoclastos

Los osteoclastos se forman a partir de células madre diferentes de la línea osteoprogenitora de los osteoblastos y osteocitos. Surgen a partir de las células madre hematopoyéticas que dan origen a los granulocitos y macrófagos (CFU-GM). Las células progenitoras de osteoclastos llegan por sangre o por migración directa desde la médula ósea al tejido óseo; allí se diferencian a preosteoclastos, que aún son mononucleados. Durante el proceso de diferenciación desde la célula madre hasta el estadio de preosteoclasto también hay proliferación. Finalmente, los preosteoclastos se fusionan y forman osteoclastos multinucleados maduros.

Los osteoclastos son las células que degradan el hueso. Son células gigantes multinucleadas de tamaño y forma muy variable. Por lo general contienen entre 5 y 10 núcleos, pero puede haber hasta 50 en una única célula. A menudo se localizan en las cavidades de la superficie del hueso denominadas lagunas de Howship. La superficie del osteoclasto presenta un borde festoneado compuesto por profundos plegamientos. El citoplasma contiene varios complejos de Golgi, numerosas mitocondrias y suele estar muy vacuolado. Se ha demostrado que muchas de las vacuolas son lisosomas primarios, los cuales dan reacción positiva para fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP). La estimulación de la resorción ósea con hormona paratiroidea estimula también la producción y el transporte de lisosomas hacia el borde festoneado; las enzimas lisosomales se vuelcan a un espacio, el espacio subosteoclástico cerrado en la periferia por una zona anular, la zona de sellado. La membrana celular del osteoclasto está aquí firmemente unida a la matriz ósea mediante moléculas de adhesión celular incluidas en ella. El líquido extracelular del espacio subosteoclástico tiene un pH de alrededor de 4, que se alcanza por acción de una ATPasa localizada en la membrana plasmática del borde festoneado, que bombea protones hacia él. De este modo se activan las enzimas lisosomales que degradan la matriz ósea orgánica mientras el líquido ácido disuelve el mineral óseo. El bloqueo de la ATPasa que bombea protones, produce el bloqueo de la resorción ósea. En el citoplasma, cerca del borde festoneado, se ha demostrado la presencia de la enzima anhidrasa carbónica que cataliza la formación de ácido carbónico a partir de anhídrido carbónico y agua, tras lo cual se liberan los protones por disociación del ácido carbónico. Durante la degradación del tejido óseo los osteoclastos son capaces de fagocitar los osteocitos, el colágeno y el mineral. Tras la finalización de la resorción se cierra la superficie ósea libre con una línea de cemento que se forma inmediatamente después y el osteoclasto con movimiento activo se desplaza con rapidez sobre la superficie del hueso para comenzar una posible nueva resorción.

La osteoclastogénesis necesita dos citoquinas esenciales para producirse, el ligando del receptor activador de NF- κ B (RANKL) que al unirse a su receptor específico (RANK) inicia la diferenciación y activación de osteoclastos. EL RANKL es un miembro de la superfamilia de factores de necrosis tumoral (TNF), se expresa en la superficie osteoblástica y actúa al unirse al receptor RANK expresado en la membrana de los precursores osteoclásticos. Existe un inhibidor circulante llamado osteoprotegerina (OPG), el cual se puede unir al RANKL y neutralizar su acción, regulando así negativamente tanto la osteoclastogénesis como la activación de osteoclastos maduros. El RANKL también actúa sobre el osteoclasto maduro estimulando la actividad resortiva influyendo sobre la organización del citoesqueleto. Otro factor requerido es el factor estimulador de colonias macrofágicas, (M-CSF) el cual es producido por los osteoblastos y promueve la proliferación de precursores y la supervivencia de todos los miembros del linaje osteoclástico, ejerciendo este efecto a través del receptor de tirosin quinasa (c-Fms). El reclutamiento y la actividad de los osteoclastos es también estimulada por citoquinas secretadas por osteoblastos, en especial IL-1, IL-6, IL-11. La estimulación de la resorción ósea es favorecida indirectamente por la PTH, a través de su unión a receptores específicos sobre los osteoblastos. Los osteoclastos carecen de este receptor y tampoco expresan receptores para 1,25-dihidroxicolecalciferol (vitamina D3 activa), como lo hacen los osteoblastos. Tras finalizar el proceso de resorción, el osteoclasto puede morir por apoptosis [Geneser, 2006]

I. 1. 3. F. Células de revestimiento óseo

En las zonas en las que no se está produciendo remodelado del tejido óseo maduro las superficies óseas están revestidas por una capa de células derivadas de los osteoblastos denominadas células de revestimiento óseo. Estas son células aplanadas con citoplasma muy delgado y escasas organelas más allá de la región perinuclear. En las superficies externas del hueso reciben el nombre de células periósticas y las que tapizan las superficies internas con frecuencia se denominan células endósticas. En los sitios en los que las prolongaciones de las células de revestimiento óseo entran en contacto entre sí hay uniones de hendidura o nexos. También se cree que intervienen en el mantenimiento y la nutrición de los osteocitos incluidos en la matriz ósea subyacente, y que regulan el movimiento del calcio y el fosfato desde la sangre hacia el hueso y desde éste hacia la sangre. Se cree que esto es debido a la presencia de prolongaciones citoplasmáticas de las células de revestimiento óseo que se extienden dentro de los canalículos de la matriz ósea contigua y que se comunican a través de nexos con las

prolongaciones de los osteocitos. En estos aspectos las células de revestimiento óseo se parecen un poco a los osteocitos.

I. 1 .4. A. Mineralización ósea

Se denomina mineralización al depósito de minerales en la matriz extracelular orgánica del cartílago y tejido óseo. Este proceso es regulado por los osteoblastos y comienza unos 20 días después de que los osteoblastos formaron la matriz ósea orgánica. En los sitios donde se inicia la mineralización de hueso la concentración local de iones Ca^{+2} y PO_4^{-3} en la matriz debe superar el nivel umbral normal; para esto la osteocalcina y otras sialoproteínas fijan Ca^{+2} , aumentando así la concentración local de este ion, lo que estimula a los osteoblastos a secretar fosfatasa alcalina. La función de esta enzima es liberar iones PO_4^{-3} , que causan un aumento local de pH hasta niveles básicos favoreciendo el depósito de Ca^{+2} al incrementar el producto de solubilidad del fosfato de calcio. En esta etapa de concentraciones extracelulares altas de Ca^{+2} y PO_4^{-3} , los osteoblastos liberan pequeñas vesículas matriciales hacia la matriz ósea que contienen fosfatasa alcalina y pirofosfatasa que escinden iones PO_4^{-3} de otras moléculas de la matriz; luego se produce la cristalización de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en las vesículas matriciales circundantes. Los cristales de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ inician la mineralización de la matriz por formación y depósito de cristales de hidroxiapatita en la matriz que rodea a los osteoblastos. Una vez que han precipitado los primeros cristales de hidroxiapatita, éstos crecen con rapidez hasta que se unen con los cristales vecinos producidos alrededor de otras vesículas.

En el tejido óseo recién formado se deposita alrededor del 80% del total del mineral al cabo de 3-4 días, lo que se denomina mineralización primaria. La mineralización completa tiene lugar en la mineralización secundaria, luego de 3-4 meses durante los cuales los cristales de hidroxiapatita crecen en tamaño por intercambio del agua ligada a los cristales por mineral [Geneser, 2006; Ross, 2007].

I. 1. 4. B. Crecimiento, modelado y remodelado óseo

El hueso crece en largo, en ancho y sufre dos procesos: modelado y remodelado. El crecimiento longitudinal y radial ocurre durante la niñez y adolescencia. En particular, el longitudinal se produce a partir de la placa de crecimiento, donde el cartílago prolifera hacia las áreas diafisarias de los huesos largos y luego se mineraliza. Durante todo el período de desarrollo, además del crecimiento longitudinal, tiene lugar la modelación de las superficies

externas e internas del hueso, dado que se deposita y resorbe tejido óseo en distintas zonas. El modelado se caracteriza por el desacoplamiento en la actividad de los osteoblastos y osteoclastos, existiendo un predominio osteoblástico. El influjo de formación conduce al incremento constante de masa ósea en el período de crecimiento hasta alcanzar un valor máximo a los 20-25 años (tamaño y forma esqueléticos definitivos) [Geneser, 2006].

El remodelado comienza en la primera infancia y continúa durante toda la vida. Durante el período de crecimiento el modelado ocurre en paralelo con el remodelado. El remodelado óseo se caracteriza por el acoplamiento entre la actividad de los osteoblastos y los osteoclastos, de modo tal que trabajan en conjunto como una unidad, donde la cantidad de tejido óseo que se resorbe es reemplazada por una cantidad equivalente de tejido óseo recién formado. Gracias a este proceso el hueso se renueva, mantiene su dureza y la homeostasis mineral, así como también previene la acumulación de micro-daños en este tejido. Este proceso está compuesto por cinco etapas secuenciales: activación, resorción, inversión, formación y por último terminación (Figura I.1.4). Los sitios de remodelamiento a veces son seleccionados al azar pero también son elegidos por áreas que requieren reparación [Clarke, 2008].

Las señales que inician la activación pueden ser debidas tanto al daño en la matriz ósea, como a hormonas. Por ejemplo, bajo condiciones basales los osteocitos secretan TGF- β el cual inhibe la osteoclastogénesis; la apoptosis de los osteocitos por daño óseo o inmovilización puede disminuir los niveles circulantes de TGF- β y de esta forma favorecer la activación osteoclástica. Otra señal involucrada en la activación es el aumento de PTH debido a una disminución de la calcemia; la unión de esta hormona a su receptor osteoblástico activa cascadas de señalización las cuales producen y modulan la secreción de moléculas que reclutan precursores osteoclásticos, inducen su diferenciación y activación, para así establecer la resorción ósea.

El levantamiento del endostio, que contienen las células de la superficie del hueso, da lugar a la fusión de múltiples células mononucleares para formar un osteoclasto multinuclear. Los preosteoclastos se unen a la matriz ósea vía receptores de integrinas de la membrana celular y péptidos RGD (arginina, glicina y aspártico) los cuales se encuentran en la matriz proteica. De esta manera se forma un compartimento sellado alrededor de la zona de remodelado óseo por debajo del osteoclasto. La resorción ósea mediada por osteoclastos tarda aproximadamente de 2 a 4 semanas durante cada ciclo de remodelado. La formación, activación y resorción osteoclástica está regulada por la relación entre el RANKL, la osteoprotegerina (OPG), IL-1, IL-6, M-CSF, PTH, 1,25-dihidroxi vitamina D y calcitonina. Durante la fase de inversión, ocurre la transición entre la resorción y la formación. Cuando se completó la remoción, la cavidad removida contiene células mononucleares, monocitos, osteocitos liberados de la matriz ósea y

preosteoblastos, los cuales fueron reclutados para la formación de hueso nuevo [Clarke, 2008]. Las señales de acoplamiento que unen la resorción ósea con el comienzo de la formación de hueso, no se conocen completamente. Las moléculas que podrían estar implicadas en este proceso son: factores derivados de la matriz del hueso tales como TGF- β , IGF-1, IGF-2, BMP o factor de crecimiento de fibroblastos. La formación de hueso toma aproximadamente de 4 a 6 meses en completarse; durante este proceso los osteoblastos sintetizan nueva matriz orgánica de colágeno y regulan la mineralización de la matriz. Cuando la cantidad de hueso resorbido es equivalente a la de hueso nuevo, el ciclo de remodelado concluye. El balance óseo es el equilibrio entre el hueso viejo resorbido y la formación de hueso nuevo. El proceso de remodelación es esencialmente el mismo en el hueso cortical y trabecular.

La tasa de recambio óseo cortical en adultos es relativamente baja (2 al 3% por año) pero es suficiente para mantener la resistencia biomecánica del hueso; mientras que en el hueso trabecular es más alta de lo necesario para el mantenimiento de la resistencia mecánica, indicando que el recambio óseo trabecular es más importante para el metabolismo mineral [Clarke, 2008; Raggatt, 2010].

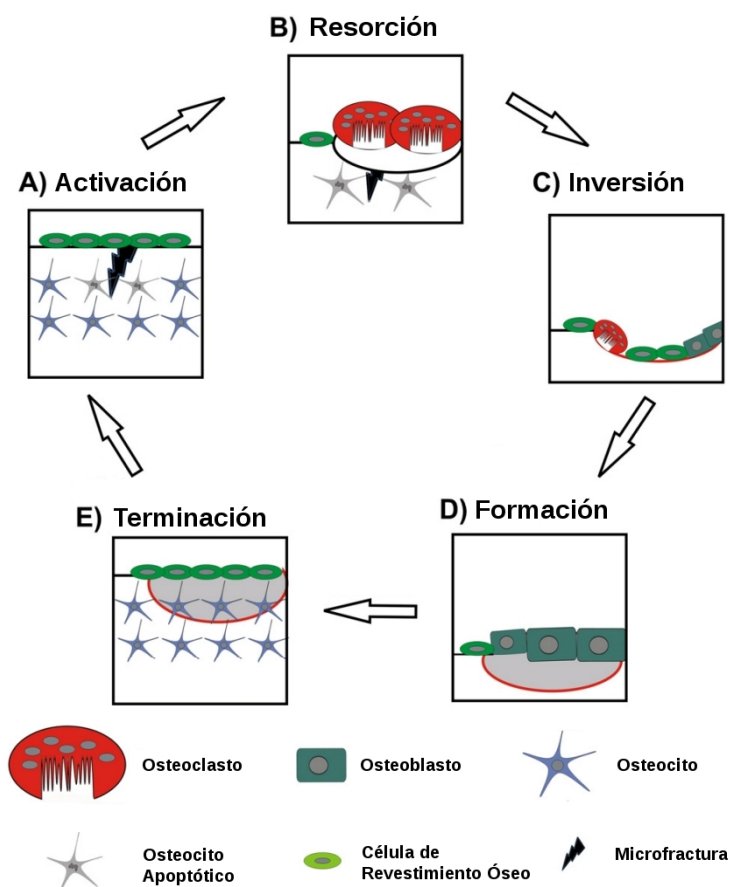


Figura I. 1. 4. Remodelado óseo (Adaptado de Henriksen, 2009).

I. 1. 5. Factores de transcripción implicados en la diferenciación de CPMO.

I. 1. 5. A. Diferenciación osteoblástica

Runx2, también llamado factor de unión nuclear alfa (CBFA1), leucemia mieloide aguda 3 (AML3) y factor específico de osteoblastos (OSF2), es un factor de transcripción que pertenece a la superfamilia de proteínas con dominio homólogo runt, contiene un dominio N-terminal rico en glutamina y alanina y un dominio C-terminal rico en prolina/serina/treonina. Runx2 se expresa en células que todavía mantienen capacidad para diferenciarse en osteoblastos o condroblastos, así como también se expresa en condrocitos hipertróficos, odontoblastos y ameloblastos.

Estudios *in vivo* e *in vitro* demostraron el rol esencial de este factor en la diferenciación osteoblástica, producción de matriz y mineralización durante la formación de hueso, dado que controla la expresión de la mayoría de los genes que codifican para las proteínas de la matriz ósea como por ejemplo: colágeno tipo I (col I), fosfatasa alcalina ósea (FALo) y osteocalcina (OC). Sin embargo, no es esencial para mantener la expresión de los genes de osteoblastos maduros y necesita ser suprimido para la formación de hueso maduro [Liu, 2013; Dalle Carbonare, 2012] (Figura I.1.5.A).

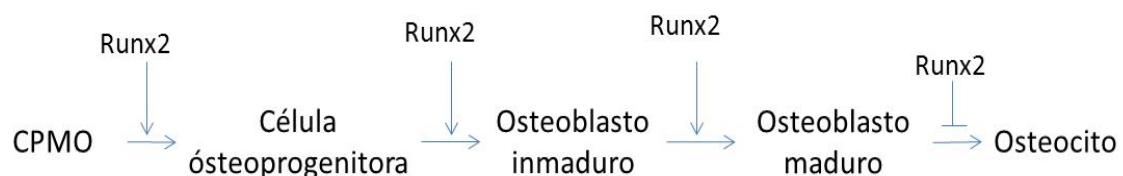


Figura I. 1. 5. A. Estadios celulares en la diferenciación de CPMO hacia osteoblastos. (Adaptado de Liu, 2013). → Significa activación y --| significa inhibición.

I. 1. 5. B. Diferenciación adipocítica

El receptor PPAR γ es miembro de la superfamilia de receptores hormonales nucleares-factores de transcripción; al ser activado forma heterodímeros funcionales y recluta factores para activar la transcripción de genes diana. Muchos compuestos sintéticos y compuestos lipofílicos naturales han sido identificados como agonistas del PPAR γ , incluyendo a las tiazolidinedonas (TZD), 15- desoxi- $\Delta^{12,14}$ prostaglandina J₂, ácidos grasos poliinsaturados y componentes de las partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL).

PPAR γ regula la formación de diversos procesos metabólicos como: adipogénesis, metabolismo lipídico, sensibilidad a la insulina e inflamación; también se encuentra involucrado en patologías como la diabetes, obesidad y aterosclerosis. Su importancia se acentúa por el uso de TZD como rosiglitazona y pioglitazona, los cuales son drogas empleadas en el tratamiento de la insulino resistencia y la diabetes tipo 2. Además, es un regulador metabólico para el destino de las células progenitoras, tanto del linaje mesenquimático como hematopoyético, dado que una vez activado, la célula se va a diferenciar al fenotipo adipocítico en detrimento de la diferenciación osteoblástica (Figura I. 1 .5. B).

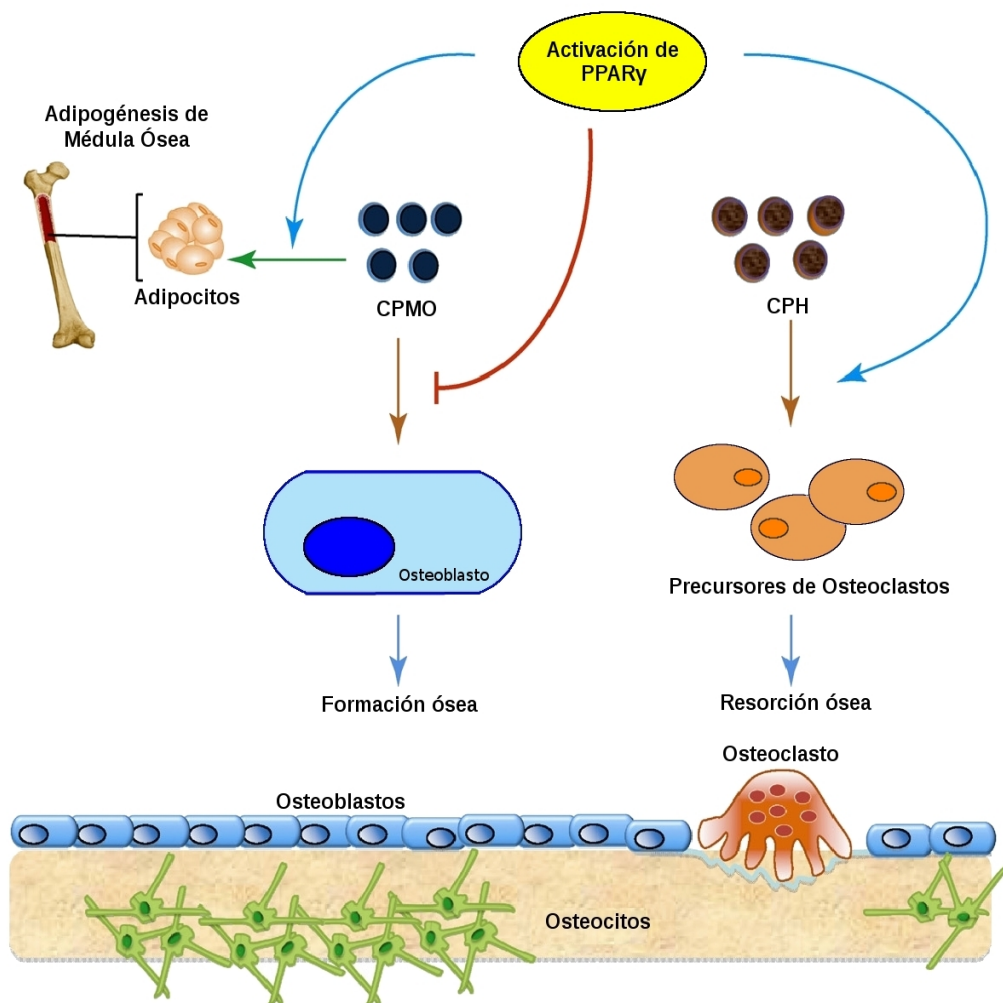


Figura I. 1. 5. B. Función del PPAR γ en la diferenciación de CPMO y de CPH. (Adaptado de Wan Y, 2010). → Significa activación y --| significa inhibición.

I. 2.1. Diabetes

En septiembre del 2012 fue reportado que 347 millones de personas sufren de diabetes. Este es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia, resultado de defectos en la secreción de insulina, su acción, o en ambas. La hiperglucemia crónica está asociada con el deterioro de varios órganos y daño a largo plazo, especialmente de ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos [Diagnosis and classification of diabetes mellitus 2013].

Diversos procesos patológicos están involucrados en el desarrollo de la diabetes. Estos abarcan desde la destrucción autoinmune de células β del páncreas (con la consecuente deficiencia en la secreción de insulina) hasta anomalías en el metabolismo de azúcares, grasas y proteínas, resultantes de la resistencia a la acción de la insulina en sus órganos blanco.

Los síntomas de la hiperglucemia incluyen poliuria, polidipsia, polifagia y algunas veces pérdida de peso y visión borrosa. La hiperglucemia crónica a veces incrementa la susceptibilidad a ciertas infecciones. La cetoacidosis y el síndrome hiperosmolar no cetósico que ocurren en los casos de diabetes no controlada, son de alta gravedad, y comprometen la vida del paciente.

Los pacientes diabéticos tienen alta incidencia de aterosclerosis y sus consecuencias clínicas más importantes son: infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular y accidente vascular periférico. También pueden padecer hipertensión y anomalías en el metabolismo de las lipoproteínas.

I. 2.1. Clasificación de la Diabetes mellitus

I. 2. 1. A. Diabetes mellitus tipo 1:

Inmunomediada. Corresponde entre 5-10% de los pacientes diabéticos, los cuales presentan destrucción autoinmune de las células β del páncreas. La diabetes autoinmune se presenta mayoritariamente en la niñez y adolescencia, pero puede ocurrir a cualquier edad, aún en la octava o novena década de vida. En el suero de estos pacientes se pueden encontrar marcadores de destrucción autoinmune como por ejemplo autoanticuerpos contra células del islote, insulina y decarboxilasa del ácido glutámico (GAD), tirosina-fosfatasa IA-2 y IA-2 β . También esta enfermedad tiene una asociación alta con el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) donde ciertos alelos pueden ser predisponentes o bien, protectores.

La tasa de destrucción de las células β es muy variable, siendo rápida en algunos individuos (principalmente en lactantes y niños) y lenta en otros (principalmente adultos). Algunos pacientes, particularmente niños y adolescentes, presentan como primera manifestación cetoacidosis; mientras que otros tienen una leve hiperglucemia en ayunas que puede cambiar rápidamente a hiperglucemia severa y/o cetoacidosis ante la presencia de algún tipo de estrés. En adultos, se puede dar el caso de que mantengan una funcionalidad suficiente de las células β como para prevenir la cetoacidosis por varios años. Los pacientes con este tipo de diabetes raramente padecen obesidad, aunque no es incompatible con el diagnóstico.

Idiopática. Algunas formas de la diabetes mellitus tipo 1 tienen etiologías desconocidas. Los pacientes tienen insulinopenia permanente y son propensos a sufrir cetoacidosis, pero no tienen evidencia de destrucción autoinmune de las células β del páncreas. Solo una minoría de pacientes está dentro de esta categoría, y dentro de los que la padecen se encontró que son de ascendencia africana o asiática. Esta forma de diabetes es altamente hereditaria.

I. 2. 1. B. Diabetes mellitus tipo 2:

Este tipo de diabetes afecta al 90-95% de los pacientes diabéticos, previamente se la conocía como diabetes no dependiente de insulina o diabetes del adulto, abarca individuos que presentan resistencia a la insulina y por lo general tienen relativa (no absoluta) deficiencia de insulina. Existen muchas causas diferentes para este tipo de diabetes, aunque la etiología específica no se conoce, se sabe que no hay destrucción de las células β del páncreas. La mayoría de estos pacientes presentan obesidad, y la obesidad por sí misma causa resistencia a la insulina, aunque no es común que sufran cetoacidosis y, en caso de padecerla, suele darse debido al estrés ocasionado por otra enfermedad como puede ser en el caso de una infección. Inicialmente, y a menudo a lo largo de toda la vida, no es necesario el tratamiento con insulina.

Este tipo de diabetes suele permanecer por años sin ser diagnosticada debido a que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente y en los primeros estadios es leve, de modo que el paciente no nota los síntomas clásicos de la enfermedad. De todos modos, estos pacientes tienen un alto riesgo de padecer complicaciones macro- y micro-vasculares. Dependiendo del estadio de la enfermedad, los pacientes con este tipo de diabetes pueden tener niveles de insulina bajos, normales o elevados (aunque siempre menores a los que se esperarían por los altos niveles de glucemia que presentan). De este modo, la secreción de insulina es deficiente en

estos pacientes e insuficiente para compensar la resistencia a la insulina, la cual puede mejorar con la reducción del peso corporal y/o tratamiento farmacológico de la hiperglucemia.

El riesgo de desarrollar este tipo de diabetes aumenta con la edad, obesidad y falta de actividad física. La enfermedad se da con más frecuencia en mujeres que previamente hayan padecido diabetes mellitus gestacional y en individuos con hipertensión o dislipemia. La frecuencia de la diabetes mellitus tipo 2 también depende de la etnia. A menudo está asociada con una gran predisposición genética, más que en el caso de la diabetes mellitus tipo 1 inmunomediada. No obstante, la genética de este tipo de diabetes es compleja y no está claramente definida.

I. 2. 2. Complicaciones de la Diabetes

I. 2. 2. A. Complicaciones Agudas

Los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 son vulnerables a sufrir tanto descompensaciones metabólicas hiperglucémicas graves (cetoacidosis) como episodios hipoglucémicos (debidos al tratamiento con insulina). La cetoacidosis se encuentra favorecida por la deficiencia de insulina acoplada con incrementos de glucagón (dado que no se encuentra contrabalanceado) lo que provoca en primer lugar hiperglucemia, como así también aumento de la lipólisis con la consecuente oferta de ácidos grasos libres al hígado para su oxidación a cuerpos cetónicos (ácido acetoacético, β hidroxibutírico y acetona) que pueden ser utilizados por las células como fuente de energía supliendo la imposibilidad del consumo de glucosa. La cantidad de cuerpos cetónicos producidos supera la capacidad de su oxidación celular y su acumulación en la sangre desencadena acidosis y agravamiento de la hiperosmolaridad.

En el caso de diabetes mellitus tipo 2, los pacientes descompensados pueden presentar coma hiperosmolar no cetósico, debido a una deshidratación severa a causa de la diuresis hiperglucémica.

I. 2. 2. B. Complicaciones Crónicas

Las complicaciones a largo plazo son las mismas para diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2, y son las principales causas de morbilidad y mortalidad. A continuación, se amplían aspectos de las diversas complicaciones, profundizando en las alteraciones óseas dado que se relaciona directamente con el tema del presente trabajo de tesis.

Macroangiopatía. Se denomina así, al daño que la diabetes va produciendo en los vasos de mediano y grueso calibre. En la diabetes se producen una serie de trastornos que, de diferentes maneras, van dañando el endotelio vascular y llegan a producir una placa de ateroma (depósito en la túnica íntima de colesterol, tejido fibroso, miocitos y células inflamatorias) que puede llegar a obstruir la luz del vaso haciendo que el flujo sanguíneo se reduzca, comprometiendo la circulación de los órganos irrigados. Además, estas placas de ateroma pueden ulcerarse formándose rápidamente un trombo sobre ellas, pudiendo obstruir el vaso (o una de sus ramificaciones) completamente y de forma repentina, dando lugar a un infarto agudo de miocardio si afecta a las arterias coronarias, o a un accidente cerebro-vascular si afecta a alguna de las arterias que irrigan el encéfalo.

Microangiopatía. En la diabetes se produce un engrosamiento de la membrana basal de los capilares, con o sin alteraciones del endotelio y/o pérdida de pericitos. También se sabe que los capilares diabéticos son más permeables a las proteínas plasmáticas. La microangiopatía diabética produce retinopatía, neuropatía, en donde se ven afectados tanto el sistema nervioso central como periférico comprometiendo en este caso a los miembros inferiores principalmente, y nefropatía diabética.

Alteraciones óseas. Este tipo de complicación, junto con las alteraciones articulares y el pie diabético entran dentro de la clasificación de complicaciones mixtas, en las cuales se interrelacionan disfunciones micro- y macrovasculares. Se ampliará con mayor profundidad en la sección diabetes y hueso.

I. 2. 3. Mecanismos de patogenicidad de la diabetes

En estudios clínicos, como el DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) y UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) [DCCT, 1986; UKPDS, 1998], se ha identificado a la hiperglucemia como uno de los factores de riesgo involucrado en el desarrollo de las complicaciones vasculares de la diabetes mellitus. Existen varias hipótesis para explicar el origen de dichas complicaciones, entre ellas:

- hipótesis de los productos de glicación avanzada (AGEs, advanced glycation – end products) [Vlassara H., 1997];
- vía de los polioles [Hotta N., 1995];
- estrés oxidativo [Baynes J.W., 1991];
- estrés reductor o pseudohipoxia [Williamson J.R., 1993];
- hipoxia verdadera [Cameron N.E., 1997];

- estrés carbonílico [Lyons, 1997],
- alteraciones en el metabolismo de las proteínas [Witztum, 1997];
- aumento de la actividad de la proteína-quinasa C (PKC) [Ishii, 1998]
- modificaciones en la actividad de factores de crecimiento [Pfeiffer, 1995] o citoquinas [Sharma, 1997];
- vía de las hexosaminas [Kolm-Litty, 1998].

Estas hipótesis se superponen unas con otras; así la formación de AGEs y la acumulación de polioles pueden provocar estrés oxidativo, el cual a su vez puede acelerar la formación de AGEs. Por otro lado, el estrés reductor puede activar la PKC; los AGEs pueden inducir la expresión de citoquinas y factores de crecimiento. En esta tesis se va a profundizar la hipótesis del aumento de AGEs y cómo éstos contribuyen con la patología diabética.

I. 2. 3. A. Productos de glicación avanzada - AGEs

La glicación no enzimática es una reacción inevitable entre azúcares reductores y proteínas que se producen en todos los sistemas vivos. Louis Camille Maillard fue el primero en ver lo que ocurría mientras se calentaba una mezcla de azúcares reductores y aminoácidos. Esta reacción se denomina pardeamiento no enzimático, y posteriormente se la llamó reacción de Maillard. Si bien la reacción es lenta, es muy dinámica en la naturaleza, y se inicia con la formación de la base de Schiff inestable, que se somete a una serie de reacciones que conducen a la formación de moléculas heterogéneas llamados productos finales de glicación avanzada o AGEs. La formación de AGEs afecta principalmente a proteínas de larga vida media, como el colágeno [Forbes, 2005], al cual se le agregan enlaces cruzados intramoleculares e intermoleculares como resultado del proceso de glicación, lo que conduce a alteraciones estructurales. Otras proteínas de vida media larga que sufren glicación son la mielina, tubulina, activador del plasminógeno 1 y el fibrinógeno [Vlaasara, 1996].

Los AGEs se acumulan en el cuerpo debido a la glicación *in vivo*, así como a través de la ingesta de AGEs exógenos, que están formadas principalmente debido a un sobrecalentamiento de los alimentos y bebidas. La ingestión crónica de los AGEs exógenos promueve la resistencia a la insulina y a la diabetes por regulación negativa del receptor anti-AGE-1 (AGER1), sirtuin 1 y regulación positiva de los receptores de AGE (RAGE) [Cai, 2012].

En condiciones de hiperglucemia o estrés oxidativo, la formación de AGEs aumenta considerablemente [Jay, 2006], y se ha descrito previamente que las personas diabéticas tienen concentraciones séricas de AGEs más altas que los individuos no diabéticos [Sharp, 2003]. Se

ha demostrado que la mayor acumulación de estos productos causa daño celular en varios niveles: (i) altera la estructura y función de la proteína, (ii) produce la agregación de proteínas, formación de fibrillas, y resistencia a las proteasas, (iii) señalización a través de la interacción con el RAGE, y (iv) la disfunción de la matriz extracelular [Kulkarni, 2013].

I. 2. 3. B. Interacción entre AGE y su receptor (RAGE)

Los AGEs formados en el plasma interactúan con sus receptores (RAGE) y activan respuestas proinflamatorias. Los RAGE son receptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas que participan en el sistema inmune innato, pueden estar unidos a la superficie celular o ser solubles. Estas proteínas son receptores de reconocimiento de patrones multiligando, con capacidad de unirse a transductores de señales de estrés celular. Los ligandos de RAGE incluyen AGE, HMGB1 (high mobility group box-1, anfoterina), proteínas S100, β -amiloide, etc. Además, el RAGE activa la producción de moléculas proinflamatorias estableciendo una relación entre la inflamación y la patogénesis de diversas enfermedades. La unión AGE- RAGE induce la producción de ROS via NADPH oxidasa y varias cascadas de señalización intracelulares incluyendo ERK1 / 2 MAPK, JAK / STAT, SAPK / JNK MAPK, Akt, rhoGTPasa, PI3kinasa, caspasa-3/7, TGF- β -Smad, p21waf, p21ras, y cdc42/rac. Muchas de estas vías de señalización resultan en la activación del factor de transcripción NF- κ B (preferentemente heterodímero p50/p65) y Sp1.

I. 2. 4. Diabetes mellitus y hueso

La diabetes mellitus y la osteoporosis son dos patologías muy comunes y su prevalencia está en continuo aumento. La osteoporosis está caracterizada por una disminución en la fortaleza y un incremento de fracturas causadas por traumas mínimos [Van Staa T.P., 2004]. Tanto la diabetes como la osteoporosis aumentan con el envejecimiento, asociándose las fracturas osteoporóticas con una mayor morbilidad, mortalidad y reducción de la calidad de vida [Johnell, 2004]. Estas patologías eran estudiadas como enfermedades aisladas, pero numerosas investigaciones han demostrado que hay una asociación entre la diabetes y el riesgo de fracturas concluyendo que la diabetes es un factor de riesgo de osteoporosis [Janghorbani, 2007, Montagnani, 2013]. Como predictor de fracturas se utiliza la técnica de absorción de rayos X de energía dual (DEXA) la cual determina la densidad mineral ósea (DMO), que si bien es muy útil, no permite analizar todos los aspectos de la calidad ósea. Se ha visto que tanto hombres como

mujeres diabéticos tienen incrementado el riesgo de fractura de cadera, específicamente de cuello femoral, comparado con personas sanas (incremento de 18 % en hombres y 11% en mujeres). En el primer año posterior a la fractura hay un aumento del 20% de mortalidad y se estima que el 50% no recuperará el nivel de función articular previo [Lipscombe, 2007]. Teniendo en cuenta la relación entre diabetes y osteoporosis, en esta tesis, se direccionó el estudio hacia la calidad ósea del cuello femoral de ratas diabéticas.

En ambos tipos de diabetes el hueso presenta frecuentemente alteraciones en su microarquitectura y en su capacidad de formación, lo cual se suele traducir en una menor calidad ósea. La diabetes mellitus puede afectar el hueso de múltiples maneras, y entre estos factores se incluyen: obesidad, cambios en los niveles de insulina, concentraciones altas de productos de glicación avanzada sobre proteínas de matriz extracelular y proteínas intracelulares, alta excreción urinaria de calcio junto con mala absorción intestinal, respuesta inapropiada a la secreción de hormona paratiroidea (PTH), alteraciones en la regulación de la vitamina D, función renal disminuida, bajos niveles del factor de crecimiento similar insulina, microangiopatías e inflamación [Isidro, 2010].

I. 2. 4. A. Densidad mineral ósea y Diabetes mellitus tipo 1

En las últimas dos décadas, varios estudios han demostrado que la osteopenia y la osteoporosis son complicaciones frecuentes en pacientes con DM tipo 1, tanto en niños como en adultos. La DMO parece estar disminuida tanto a nivel de la columna vertebral como en la cadera. Utilizando DEXA se ha encontrado que un 50-60% de pacientes con DM tipo 1 presentan osteopenia, mientras que alrededor de un 14-20% de dichos pacientes tienen osteoporosis [Kayath, 1998; Kemink, 2000]. Algunos autores sugieren que la disminución en la DMO (es decir, la osteopenia u osteoporosis) podría deberse al hecho de que no se alcance el pico de masa ósea en la pubertad. Sin embargo, se han encontrado niveles disminuidos de DMO aún en pacientes que han desarrollado DM luego de alcanzar el pico de masa ósea [Tuominen, 1999].

La relación entre DMO y el grado de control de la glucemia es poco clara [Heap, 2004]. Diversos autores proponen que la terapia con insulina y el logro de un buen control metabólico son determinantes para un aumento en la formación de matriz ósea, acoplado con una disminución en la resorción, lo que determinaría un balance positivo en el remodelado óseo [Bonfanti, 1997].

I. 2. 4. B Densidad mineral ósea y Diabetes mellitus tipo 2

Pacientes con diabetes mellitus tipo 2 presentan valores de DMO normales o aumentados, pero a pesar de esto tienen incrementado el riesgo de fracturas [Lipscombe L., 2007]. Se han encontrado anomalías estructurales; por ejemplo, en el radio se observó un aumento del 10% en el volumen trabecular adyacente a la corteza, y un adelgazamiento de las trabéculas en las tibia. Sin embargo, la porosidad del hueso cortical del radio fue mayor en pacientes diabéticos que en pacientes sanos, defectos que podría disminuir la dureza ósea [Burghardt A., 2012]. También se ha reportado que disminuye el recambio óseo en pacientes con DM tipo 2, debido a una disminución tanto en la formación como en la resorción [Achemlal, 2005]. Los mecanismos implicados detrás de estos cambios óseos pueden ser diferente entre los pacientes diabéticos y podrían estar afectados por la obesidad, complicaciones diabéticas, edad, duración de la diabetes, co-morbilidades y hasta incluso la medicación empleada en el tratamiento de la diabetes, siendo el mejor ejemplo de esto último el efecto del antidiabético tiazolidinediona como se verá más adelante.

Si bien la evaluación de la DMO ha sido la forma más efectiva de evaluar el riesgo de fracturas en personas con osteoporosis, no es útil dicho índice por lo que se ha descrito anteriormente para la evaluación del riesgo de fracturas en pacientes diabéticos. Por eso resulta necesario encontrar otros marcadores de diagnóstico, como la pentosidina (un producto de glicación avanzada). Varios estudios han revelado que el contenido de pentosidina en el hueso cortical o trabecular de vértebras o fémures se relacionó negativamente con las propiedades mecánicas [Hernández, 2005; Wang X., 2002; Viguet-Carrin, 2006], y que la cantidad de pentosidina presente en hueso cortical o trabecular proveniente de pacientes diabéticos con fractura de cuello femoral fueron mayores que en individuos controles de la misma edad [Saito, 2006]. No obstante, la medida de contenido de pentosidina, no es algo fácil de realizar, ya que implica la realización de procedimientos invasivos como una biopsia ósea. Sin embargo, recientemente un estudio reveló que el contenido de pentosidina en plasma correlaciona linealmente con el contenido de esta sustancia en el hueso cortical [Odetti, 2005], sugiriendo que el mismo puede ser usado como marcador para evaluar la resistencia ósea en forma indirecta.

I. 2. 4. C. Patofisiología del mayor riesgo de fracturas en la Diabetes mellitus

Como se enumeró anteriormente, existen varios factores que podrían contribuir al mayor riesgo de fracturas óseas. Los AGEs, son compuestos que se forman normalmente con la edad,

pero en pacientes diabéticos se acumulan aceleradamente. El proceso de recambio óseo puede ser influenciado y alterado por modificaciones que los AGEs provocan en las proteínas del hueso. Nuestro grupo ha estudiado el efecto que los AGEs provocan en cultivos de células óseas, encontrando que:

- La acumulación de AGEs sobre la matriz extracelular, así como el agregado de proteínas solubles modificadas por AGEs a cultivos de osteoblastos, inicialmente estimulan la proliferación celular. Sin embargo, incubaciones a largo plazo inhiben la diferenciación (expresión de FAL y secreción de colágeno tipo I) en forma dependiente de la dosis [McCarthy, 1997; McCarthy, 2001]. Por otro lado, la glicación de la FAL induce una inhibición de su actividad [McCarthy, 1999].

- El colágeno modificado por AGEs es capaz de afectar la proliferación y diferenciación de los osteoblastos inhibiendo la actividad de FAL y la formación de nódulos de mineralización. También se ha demostrado que la acumulación de AGEs sobre el colágeno altera las interacciones celulares con la matriz extracelular mediada por integrinas [McCarthy, 2004].

- Los efectos mencionados podrían estar mediados a través del sistema de los factores de crecimiento insulino-símiles (IGFs) y sus proteínas ligadoras por un mecanismo autócrino-parácrino [McCarthy, 2001], e involucrar diversas vías de transducción de señales como las ERK [Cortizo, 2003] y el estrés oxidativo intracelular (inducción de ROS y NO) [McCarthy, 2001].

Otros autores encontraron que la osteocalcina puede ser glicada, lo que alteraría su afinidad por la hidroxiapatita y jugaría un rol en la patogénesis de la osteoporosis y osteopenia presente en la diabetes [Gundberg, 1986]. Se sabe además, que los enlaces cruzados de las moléculas de colágeno, juegan un rol crítico en la determinación de la resistencia ósea [Saito, 2010]. Los enlaces entrecruzados de las moléculas de colágeno que se forman espontáneamente por glicación no enzimática (AGEs) otorgan fragilidad a las fibras de colágeno [Garnero, 2006; Vashishth, 2007], mientras que los entrecruzamientos fisiológicos (enzimáticos) fortalecen los vínculos entre las fibras de colágeno y confieren así resistencia ósea [Wang, 2002; Banse, 2002]. En un modelo de ratas diabéticas se encontró que hubo una disminución de los enlaces entrecruzados de colágeno formados enzimáticamente y se detectó un incremento en el entrecruzamiento generado por AGEs, lo que resultó en un deterioro sobre la resistencia ósea, sin afectar el índice de DMO [Saito, 2006].

I. 2. 5. Tratamiento de la Diabetes mellitus tipo 2

Existen varios tratamientos para la diabetes mellitus tipo 2, pero en esta sección se hará referencia solo a las drogas utilizadas en este trabajo de Tesis.

I. 2. 5. A. Metformina

La metformina es una de las principales drogas utilizadas en el tratamiento de la diabetes tipo 2, siendo una de las más prescritas en todo el mundo [Gong, 2012]. Desde el punto de vista químico es una biguanida, cuya acción farmacológica es disminuir los niveles basales y posprandiales de glucosa plasmática. Posee otros beneficios adicionales como reducción del peso corporal, disminución de los niveles plasmáticos de lípidos y prevención de las complicaciones cardiovasculares, y es bien tolerada en la mayoría de los pacientes. La metformina también está recomendada para otras patologías como el síndrome de ovario poliquístico y el síndrome metabólico. Sin embargo, el control glucémico mediado por la metformina es muy variable: algunos pacientes responden extremadamente bien mientras que otros no presentan beneficios demostrables. Por este motivo, puede indicarse en monoterapia o en combinación con otros agentes antidiabéticos incluyendo sulfonilureas, inhibidores de la α -glucosidasa, insulina, tiazolidinedionas e inhibidores de la DPP-4 así como también agonistas de la GLP-1.

Farmacocinética

La metformina se administra por vía oral, siendo su absorción lenta e incompleta principalmente en el intestino delgado. Después de su absorción gastrointestinal, se distribuye rápidamente a los tejidos corporales periféricos, incluyendo intestino, hígado y riñón utilizando transportadores de cationes orgánicos [Graham, 2011], debido a que prácticamente no se une a las proteínas plasmáticas. El estado estacionario suele alcanzarse al cabo de uno o dos días. Tiene una biodisponibilidad del 50 al 60% y la concentración máxima en el plasma sanguíneo (C_{max}) se observa entre 2 y 4 horas después de su administración [Bristol-Myers Squibb. U.S. Food and Drug Administration, 2009]. No es metabolizada en el hígado o el tracto gastrointestinal y es excretada sin cambios en su estructura química en la orina, siendo su vida media aproximadamente de 5 h. La secreción tubular activa en riñón es la principal ruta de eliminación de la metformina. Hay un gran intervalo de variabilidad en la farmacocinética de la metformina y las concentraciones plasmáticas pueden variar desde 54 a 4133 ng/ml [Christensen, 2011].

Farmacodinamia

Esta droga actúa principalmente suprimiendo la producción excesiva de glucosa hepática, a través de la reducción en la gluconeogénesis. Otros efectos incluyen incrementar la captación de glucosa en el hígado, incrementar la señalización de la insulina, disminuir la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos e incrementar la β -oxidación; también incrementa la utilización periférica de glucosa, reduce la ingesta de glucosa y la absorción de glucosa intestinal. Como la metformina no estimula la secreción de insulina, no causa hipoglucemia o hiperinsulinemia como lo hacen otras drogas antidiabéticas.

Los mecanismos moleculares por los cuales la metformina ejerce su acción son complejos. Se sabe que la metformina induce la activación / fosforilación de la proteína AMP kinasa (AMPK) en el hígado, la cual lleva a la acción de diversos efectos farmacológicos como la inhibición de la síntesis de glucosa y lípidos. Se ha demostrado que la metformina inhibe la gluconeogénesis hepática a través de la regulación del receptor nuclear huérfano SHP, pero la reducción en la gluconeogénesis puede ocurrir de dos maneras, AMPK- dependiente y AMPK- independiente. Aunque no se conoce el blanco directo de la metformina, se sabe que ésta inhibe el complejo mitocondrial I de la cadena respiratoria, lo cual produce un aumento de la relación celular AMP/ATP, lo cual puede activar la enzima AMPK. AMPK es el mejor regulador del metabolismo de los lípidos y la glucosa; la AMPK activada fosforila e inhibe a la HMG-CoA reductasa (síntesis de colesterol), MTOR (señalización de la insulina); ACC-2; ACC; glicerol 3-fosfato aciltransferasa (síntesis de ácidos grasos y triglicéridos) y la proteína que se une al elemento de respuesta a carbohidratos [Gong, 2012]. Finalmente, en el músculo esquelético la activación de la AMPK resulta en un incremento del consumo de glucosa por aumento de GLUT4.

Resumiendo, el principal efecto farmacológico de la activación de la AMPK en el hígado incluye la oxidación de ácidos grasos, con la inhibición de la síntesis de colesterol y triglicéridos. Mientras que los efectos periféricos incluyen la estimulación de la oxidación de ácidos grasos y el consumo de glucosa por el músculo esquelético así como también el incremento sistémico de la sensibilidad a la insulina.

Metformina y salud ósea

En estudios realizados en cultivos de osteoblastos, la metformina fue capaz de revertir los efectos deletéreos de los AGEs [Schurman L, 2008]. Así mismo, estudios en animales mostraron que la metformina tiene efectos positivos en la diferenciación osteoblástica incrementando la actividad de Runx2, y efectos negativos en la diferenciación osteoclástica,

disminuyendo los niveles de RANKL y aumentando los de OPG en ratas ovariectomizadas [Mai QG, 2011]. Los estudios en humanos, sugieren que la metformina disminuye el riesgo de fracturas en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 [Melton LJ, 2008]. Sin embargo, un estudio (ADOPT) no demostró efectos beneficiosos de la metformina sobre el riesgo de fractura [Kahan, 2008].

I. 2. 5. B. Tiazolidinedionas

Las tiazolidinedionas (glitazonas) son drogas insulino-sensibilizadoras. Fueron los primeros fármacos desarrollados para regular la resistencia a la insulina, e inducen una mayor sensibilidad tanto a la insulina endógena como exógena. Estos fármacos actúan por unión a receptores nucleares (*peroxisome proliferator-activated receptor γ* [PPAR γ]). La unión de la droga al PPAR γ , activa la transcripción de varios genes específicos implicados en el metabolismo de los lípidos, tales como la proteína de adipocitos 2, la lipoproteína lipasa, y la acil coenzima A sintetasa. Las tiazolidinedionas reducen eficazmente los niveles de HbA1c y se asocian con un riesgo bajo de hipoglucemia. Estos agentes han sido ampliamente recetados, en sus primeros tres años de venta. Los informes de prensa indicaron que 3 millones de pacientes en Estados Unidos recibieron rosiglitazona. Sin embargo, este tipo de drogas se ha asociado con severos efectos adversos los cuales ponen en duda la seguridad de la droga. En 2000, la troglitazona fue retirada del mercado en los Estados Unidos después de los informes de hepatotoxicidad, incluyendo insuficiencia hepática grave y muerte. Las glitazonas de segunda generación (rosiglitazona y pioglitazona) se han asociado con el aumento de peso y retención de líquidos, y aunque se desconoce el mecanismo, la retención de líquidos puede aparecer muchos meses después de iniciada la terapia y puede conducir a falla cardíaca. Esto requiere la evaluación cuidadosa de los pacientes antes y durante el tratamiento. Luego de estos informes sobre su seguridad, hubo una gran disminución en el uso de rosiglitazona. La Asociación Americana de Diabetes y la Asociación Europea de Seguridad para el Estudio de la Diabetes realizaron nuevas indicaciones para el manejo médico de la hiperglucemia y ya no se recomienda el uso de la rosiglitazona como fármaco de primera elección. La rosiglitazona ha sido retirada del mercado por agencias reguladoras Europeas y restringida por la FDA, y no se recomienda el uso de la pioglitazona en pacientes con insuficiencia cardíaca. A pesar de esto, los agonistas de PPAR γ han sido usados por más de 20 años para el tratamiento de la DMT2 [Guthrie, 2012].

Farmacocinética

La biodisponibilidad se aproxima al 99% después de administración oral, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas en aproximadamente 1 hora, siendo su vida media de 3 - 4 h. La unión a proteínas plasmáticas es aproximadamente del 99,8%. Se metaboliza de manera amplia en el hígado a través del citocromo P450 CYP2C8 y la vía principal de eliminación es la urinaria (67%); la vía fecal justifica un 25% de su eliminación.

Farmacodinamia

Los PPAR son receptores nucleares que intervienen en la regulación de diversos genes. Hasta hoy se han descubierto tres clases: PPAR α , PPAR β , y PPAR γ . Los PPAR γ se expresan en la mayoría de los tejidos, pero hay una alta densidad de estos receptores en tejido adiposo, músculo, hígado y cerebro.

En estudios clínicos, se ha observado que en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 se reducen los niveles de glucosa en sangre luego del tratamiento con TZD. Esto podría deberse a que las TZD podrían aumentar la expresión (síntesis y translocación) del transportador de glucosa, GLUT4, en tejido adiposo y músculo, con lo cual mejora el transporte de glucosa, disminuyendo la hiperglucemia.

Por otro lado, los PPAR γ participan de forma directa en la adipogénesis, es decir en la diferenciación de preadipocitos en adipocitos así como también en su proliferación. En el páncreas, estimula la secreción de insulina; en el hígado aumenta el almacenamiento de lípidos y la gluconeogénesis; y en el músculo esquelético incrementa la sensibilidad a la insulina [Ahmadian, 2013]

Tiazolidinedionas y hueso

Estas drogas fueron introducidas en el mercado hace aproximadamente 20 años para el tratamiento de DM2, pero sólo 6 años después de su comercialización se empezaron a reportar efectos negativos en el tejido óseo [Kung, 2012]. Estudios *in vivo* e *in vitro* demostraron que la activación de PPAR γ suprime la expresión de IGF-1 con el consecuente efecto deletéreo sobre el hueso [Lecka-Czernik, 2007]. En ratones y ratas, las TZD causan pérdida de hueso debido a una disminución de la formación de hueso (osteoblastogénesis) y un incremento simultáneo de la resorción ósea (osteoclastogénesis) [Wei W, 2010]. Se ha visto que PPAR γ inhibe la diferenciación osteoblástica: células progenitoras embrionarias nulas para el gen de PPAR γ no

pueden diferenciarse a adipocitos y espontáneamente lo hacen hacia osteoblastos [Akune, 2004]. Por otro lado, ratones con una delección en PPAR γ de la línea hematopoyética presentan deficiencia osteoclástica y resistencia frente a la resorción ósea estimulada por TZD [Wan Y, 2007].

Estudios clínicos con pacientes con DMT2 demostraron que las tiazolidinedionas, en especial la rosiglitazona, incrementan el riesgo de fracturas comparado con otras clases de drogas antidiabéticas, disminuyen la DMO, y reducen los niveles séricos de marcadores de formación ósea. El tratamiento con rosiglitazona durante 14 semanas en mujeres no diabéticas posmenopáusicas mostró una reducción en la DMO en cadera comparado con la DMO antes de iniciar el tratamiento [Grey A, 2007]. También se vieron disminuidos los marcadores de formación ósea como ALP, P1NP (fracción N terminal del propéptido de colágeno tipo I), mientras que los marcadores de resorción no se encontraron alterados, concluyendo que la terapia a corto plazo con rosiglitazona presenta deterioro esquelético por disminución en la formación ósea. En contraste con este estudio, el tratamiento durante 16 semanas en mujeres con diabetes tipo 2 resultó en un aumento de los marcadores de resorción mientras que no modificó los marcadores de formación [Gruntmanis, 2010].

I. 2. 6. Modelos animales utilizados para el estudio de Diabetes mellitus tipo 2

Los modelos animales de DM tipo 2 son tan complejos y heterogéneos como lo es el propio síndrome en humanos. En algunos predomina la resistencia a la insulina mientras que en otros la principal disfunción se encuentra en las células β del páncreas provocando alteraciones en la secreción de insulina. Además, existen modelos en donde la intolerancia a la glucosa es parte de un fenotipo más complejo, tal como el que incluye obesidad, dislipemia e hipertensión. [Arias-Díaz, 2007].

Estos modelos se pueden clasificar según el mecanismo de generación en: **modelos espontáneos**, aquellos en donde se seleccionan los animales que espontáneamente desarrollan diabetes; o **modelos inducidos**, a los cuales se promueve el desarrollo de la enfermedad mediante el uso de fármacos, o cambios en la dieta, etc. A su vez, dentro de los modelos espontáneos existen los **modelos análogos**, que son útiles como sustitutos de la enfermedad humana pues tratan de simular la enfermedad; y los **modelos intrínsecos**, que sirven para contestar alguna pregunta concreta de aspectos específicos de la enfermedad, pero no tratan de imitarla [Arias-Díaz, 2007]. A continuación se realiza una breve reseña de los modelos más utilizados.

I. 2. 6. A. Modelos espontáneos

Se trata de estirpes que se mantienen relativamente inalteradas mediante cruces endogámicos y que proceden, ya sea de un animal en el que se ha detectado DM tipo 2 espontánea, o bien de una serie de cruces selectivos favoreciendo un determinado rasgo fenotípico de la DM tipo 2 humana. A veces no son totalmente "espontáneos" en el sentido que se requieren modificaciones dietéticas adicionales para generar la DM tipo 2 en el seno de una predisposición genética. Dentro de estos modelos encontramos:

Modelos análogos: como es muy amplio el abanico de estos modelos para el estudio de la DM tipo 2, a continuación solo se presentan algunos de ellos:

- *Rata Goto Kakizak (GK):* este modelo reproduce bien las principales características de la DM tipo 2 humana: hiperglucemia, reducción de la tolerancia a la glucosa, deterioro en la secreción de insulina, aumento de la resistencia periférica, alteración en el metabolismo lipídico. Sugiere la participación de 6 regiones cromosómicas en la etiología de la enfermedad y así como también la existencia de factores epigenéticos.
- *Ratón obeso de Nueva Zelanda (NZO):* se trata de una cepa endogámica seleccionada por obesidad poligénica. Hay un defecto en el transporte de leptina a través de la barrera hemato-encefálica. [Michael Igel, 1997]. El desarrollo de DM en este modelo está íntimamente relacionado con la de adiposidad precoz, con establecimiento de un nivel diabetogénico de resistencia a la insulina. [Arias-Díaz, 2007].
- *Ratón KK (Kuo Kondo):* es uno de los modelos poligénicos más adecuados como análogo de la DM tipo 2. Es producido por endocría selectiva de animales de mayor peso que lo normal. [Wakasugi, 1967].
- *Rata OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat):* ratas con diabetes espontánea, poliuria, polidipsia y discreta obesidad. Estos animales son portadores de un alelo nulo para el gen de la colecistoquinina A, lo que conlleva a una capacidad reducida para procesar las señales gastrointestinales de saciedad tras la ingesta de nutrientes. [Arias-Díaz, 2007; Kawano K, 1992].

Modelos intrínsecos: como se comentó previamente, estos modelos son valiosos sobre todo para

el estudio de la fisiología y de los mecanismos patogénicos que intervienen en la DM tipo 2 y sus complicaciones tardías.

- *Ratón db/db*: existe una mutación en el gen que codifica para el receptor de la leptina, dando lugar a un déficit de señalización de dicha hormona adipocitaria [Arias-Díaz, 2007].
- *Ratón ob/ob*: son animales portadores de una mutación en el gen de la leptina, y es un buen modelo para el estudio de la obesidad, siendo la incidencia de DM relativamente baja [Chua SC, 1996].
- *Rata Zucker Obesa ZUC- Lep^{fa/fa}*: presentan resistencia a la leptina (mutación en el receptor largo de leptina), y constituye un excelente modelo para el estudio de síndrome metabólico [Zucker LM and Zucker TF, 1961].
- *Rata Zucker Diabética ZDF-Lep^{fa}/Crl*: derivan de ratas Zucker en las que se presentó espontáneamente DM tipo 2. Mediante un programa de cría se dio lugar a un patrón genético consistente con la expresión de un gen dominante no relacionado al gen fatty [Clark JB, 1983].

I. 2. 6. B. Modelos inducidos

Son aquellos en los que se pueden reproducir una o más de las manifestaciones clínicas de la DM tipo 2 humana en animales de laboratorio a través de diferentes estrategias, como por ejemplo mediante manipulación genética, o a través de dietas específicas, o por la administración de fármacos. A este último modelo le prestaremos particular atención debido a que es de interés en el presente trabajo.

- *Manipulación genética*: se modifican genes específicos para sobre-expresar, eliminar o reemplazar algún gen de interés.
- *Inducidos por la dieta*:

Dieta rica en grasas: los animales desarrollan DM tipo 2 asociada a la obesidad como resultado de dietas ricas en grasas, presentando hiperglucemia post-prandial e intolerancia a la glucosa, hipertrofia de células beta, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, resistencia a la leptina e hipertensión.

Rata de la arena (*Psammomys obesus*): son animales que desarrollan obesidad y diabetes en cautiverio al modificarse su dieta vegetariana natural [Schmidt-Nielsen et al., 1964].

- *Administración de fármacos*: en estos modelos hay pérdida selectiva de las células *beta* del páncreas, dejando a las células *alfa* y las *delta* intactas. Comparativamente, son modelos fáciles de desarrollar y mantener.
 - *Ratones diabéticos y obesos por tioglucosa aurica (GTG)*: la GTG es un compuesto derivado de la glucosa que produce daño en la región ventromedial del hipotálamo causando lesiones necróticas que llevan al desarrollo de hiperfagia y obesidad. Además, se ha demostrado que la GTG interfiere en la vía de señalización de la insulina. Una gran desventaja es que los animales tardan mucho tiempo en desarrollar la enfermedad y la tasa de mortalidad luego de la inyección de GTG es muy alta [Pace C, 1987].
 - *Diabetes inducida por aloxano (ALX) y estreptozotocina (STZ)*: el ALX actúa de forma selectiva destruyendo los islotes pancreáticos y llevando a una deficiencia de insulina, hiperglucemia y cetosis. Esta cetosis provoca alta mortalidad [Srinivasan, 2005]. Este tipo de modelo se utiliza mayormente para diabetes de tipo 1.
 - *Modelo de diabetes inducida por estreptozotocina y nicotinamida (STZ-NA)*. Este modelo se desarrolla a continuación con mayor detalle debido a que es el modelo que hemos elegido para el presente trabajo de tesis doctoral.

I. 2. 6. C. Modelo de diabetes inducida por STZ-NA.

La streptozotocina es una droga diabetogénica que ejerce su citotoxicidad en células β pancreáticas, mientras que la nicotinamida posee acción protectora parcial frente a la STZ [Szkudelski, 2012]. Debe ser enfatizado el hecho de que la inducción de diabetes con STZ-NA varía según las concentraciones de las dos drogas, la edad del animal, el tiempo de administración de NA en relación con la administración de STZ, la vía de administración de la STZ y el estado nutricional de la rata. Cuando la dosis de NA es relativamente baja, la función protectora es despreciable. A su vez, las células β pancreáticas de animales jóvenes son menos sensibles a la acción de la STZ, y son mejor protegidas por la NA. Se sabe que el efecto protector de la NA disminuye con el tiempo transcurrido después de la administración de STZ, es

por esto que en la mayoría de los experimentos la NA se administra 15 minutos antes que la STZ.

Características del modelo:

- Tolerancia a la glucosa: El test de tolerancia a la glucosa en humanos con diabetes tipo 2, induce un incremento en la glucosa sanguínea la cual es marcadamente mayor que en personas sanas. Esto resulta tanto por la insulino-resistencia como por la disminución en la función de las células β . La administración de glucosa a animales sanos produce un pico rápido de insulina. De forma opuesta a este comportamiento dinámico, en ratas diabéticas, la secreción de la insulina en respuesta a glucosa se ve disminuida casi sin presentar modificaciones en la insulinemia y en consecuencia la intolerancia a la glucosa observada en ratas STZ-NA es debida principalmente a la alteración en la secreción de insulina.

Los islotes pancreáticos de humanos con diabetes tipo 2, presentan una disminución en la primera fase de secreción de insulina, y la segunda fase se encuentra deteriorada.

La secreción de insulina en células β provenientes de ratas tratadas con STZ-NA frente a un estímulo con glucosa responden con un inicial incremento en la secreción de insulina, sin ser observada la segunda fase de secreción. La secreción total de insulina se halla disminuida. El grado de disminución está relacionado con la cantidad de STZ y NA que fue administrada.

- Secreción de insulina: En humanos con diabetes tipo 2, la insulino resistencia es inicialmente compensada por un incremento en la secreción de insulina para mantener la glucemia en valores normales. Este mecanismo compensatorio está implicado en el incremento de la función secretora de las células β y en el aumento en la masa de células. Sin embargo, con el transcurso del tiempo, la secreción exagerada de insulina lleva al fracaso de las células β , las células entran en apoptosis y la masa celular se reduce. En este contexto, los islotes de ratas tratadas con STZ-NA correspondería con un estado de diabetes tipo 2 con reducción en la masa de células β en humanos.
- Estrés oxidativo: En humanos con diabetes tipo 2, el estrés oxidativo está incrementado en diferentes tejidos y está implicado en las complicaciones diabéticas. En el modelo de STZ-NA también se encuentra un incremento en el estrés oxidativo evidenciado en el aumento del factor de necrosis tumoral α , interleuquina 1b, IL-6. factor nuclear kB (NF-kB) unidad p65 y NO respecto a animales control. Estudios recientes han demostrado incapacidad en el sistema de defensa antioxidativo en estas ratas y, en consecuencia,

los niveles de lípidos, peróxidos, hidroperóxidos y proteínas carboxiladas son significativamente más altos en plasma, tejido pancreático y riñón en animales diabéticos. En simultáneo, la actividad de superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión-S- transferasa se encontraron disminuidas en eritrocitos, tejido pancreático, hígado y riñones de rata con diabetes comparada con animales sanos. Sin embargo, los cambios observados en ratas STZ-NA son menos marcado que en ratas tratadas con STZ solamente.

O B J E T I V O S



Objetivos Generales

- a) Evaluar los efectos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* de drogas antidiabéticas (metformina y/o rosiglitazona) sobre la diferenciación de CPMO y la microarquitectura ósea de ratas control.
- b) Investigar el efecto *in vivo* y *ex vivo* del tratamiento con metformina sobre el tejido óseo, en un modelo de ratas diabéticas.

Objetivos Específicos

- a)
 1. Estudiar el efecto directo *in vitro* de la metformina y/o la rosiglitazona sobre la diferenciación osteoblástica y adipogénica de CPMO en cultivo.
 2. Investigar el efecto *ex vivo* de metformina, rosiglitazona o su combinación, sobre el potencial osteogénico de CPMO provenientes de ratas controles.
 3. Investigar el efecto *in vivo* de la metformina y/o rosiglitazona sobre la microarquitectura de fémures de ratas controles.
 4. Determinar los mecanismos de transducción de señales asociadas con el compromiso osteogénico y adipogénico de las CPMO.

- b)
 1. Analizar las alteraciones óseas a nivel del fémur asociadas al modelo de diabetes con déficit parcial de insulina.
 2. Investigar el efecto *ex vivo* de la metformina, sobre el potencial osteogénico de CPMO provenientes de ratas diabéticas tratadas o no con metformina.
 3. Determinar los mecanismos de transducción de señales asociadas con la diferenciación de CPMO provenientes de ratas diabéticas, así como los efectos del tratamiento con metformina.

*MATERIALES
& MÉTODOS*



II. 1. Estudios *in vitro*.

Todos los estudios *in vitro* se realizaron con células progenitoras de médula ósea (CPMO) de rata.

II. 1. 1. Obtención de CPMO.

Las células progenitoras de médula ósea se obtuvieron a partir de ratas Sprague-Dawley, las cuales fueron anestesiadas y luego sacrificadas por dislocación cervical. Se aislaron los fémures y las tibias y se inyectó medio de cultivo esencial modificado por Dulbecco (DMEM), (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) a través del canal medular bajo condiciones de esterilidad [Tropel, 2004]. La suspensión resultante fue incubada en frascos de cultivo de 25 cm² con DMEM suplementado con penicilina (100 UI/ml), estreptomina (100 µg/ml), y 10% de suero fetal bovino (SFB) (Natacor, Córdoba, Argentina) e incubada a 37°C en atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO₂ y 95% de aire. Al cabo de 24 hs se cambió el medio de cultivo y de esta forma las células que no se habían adherido al plástico fueron descartadas.

Las CPMO poseen morfología fibroblástica, con núcleo central y citoplasma alargado (Figura II.1.).

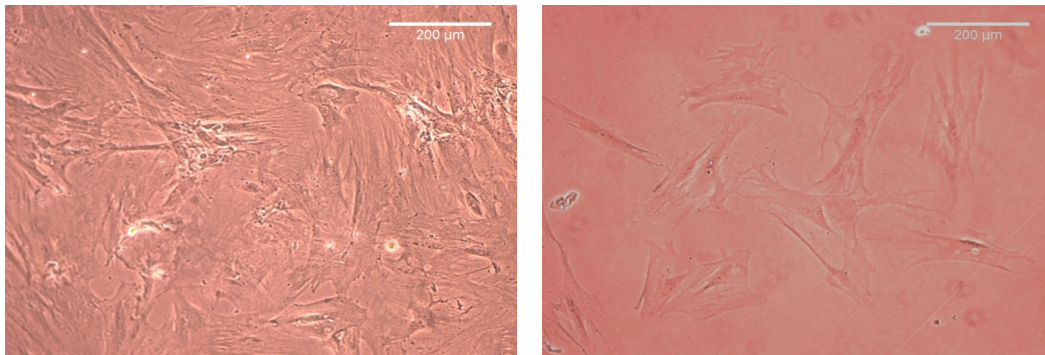


Figura II. 1. Aspecto del cultivo de células progenitoras de médula ósea (CPMO).

Cuando las células llegaron a confluencia (luego de 10 – 15 días), la monocapa fue despegada del frasco de crecimiento utilizando 0.025% de tripsina (GIBCO, Invitrogen, Bs. As. Argentina) en solución salina tamponada con fosfatos (PBS) – 1 mM de EDTA. Las células fueron resuspendidas en DMEM con 10% SFB y replaqueadas en frascos de 75 cm² o en platos multipocillo de cultivo.

II. 1. 2. Diferenciación osteoblástica de CPMO.

Las CPMO fueron plaqueadas a una densidad de 5×10^4 células/pocillo, en platos de 24 pocillos. Cuando las células llegaron a una confluencia del 70-80% se las diferenció a osteoblastos usando medio de diferenciación osteoblástico (DMEM – 10% SFB adicionada con 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido ascórbico y 5 mM de β -glicerol-fosfato de sodio) durante 15 y 21 días [Cortizo, 2006], el cual fue cambiado tres veces por semana. El ácido ascórbico y el β -glicerofosfato son esenciales para la expresión fenotípica de osteoblastos. El primero es necesario para la deposición de colágeno en la matriz extracelular, a pesar de que no induce la expresión de los genes de colágeno tipo I, ya que actúa como un cofactor de la síntesis de esta molécula, e induce la actividad de fosfatasa alcalina en células maduras pero no en células inmaduras. El β -glicerofosfato tiene una actividad sinérgica junto con el ácido ascórbico estimulando la acumulación de colágeno y la actividad de fosfatasa alcalina [Quarles LD, 1992]

La diferenciación osteoblástica fue evaluada determinando la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina, la producción de colágeno tipo I, y la presencia de depósitos extracelular de calcio, como se describirá más adelante.

II. 1. 2. A. Determinación de parámetros de diferenciación osteoblástica.

- Actividad de fosfatasa alcalina: La monocapa de células se lavó con PBS y se solubilizó en Tritón X-100 al 0,1%. Una alícuota del extracto celular se usó para determinar proteínas por el método de Bradford [Bradford, 1976]. La actividad de fosfatasa alcalina se midió espectrofotométricamente utilizando p-nitrofenilfosfato (p-NPP) como sustrato. El p-nitrofenol (producto coloreado de la hidrólisis) se determinó por absorbancia a 405 nm luego de incubar la mezcla de reacción a 37°C en buffer pH 10,4 durante un período de tiempo predeterminado [Cortizo, 1995]. Los resultados medidos como nmoles p-NPP/mg de proteína/minuto se expresaron como porcentaje (%) del basal.
- Producción de colágeno tipo I: La producción de colágeno tipo I se determinó utilizando un método colorimétrico mediante la técnica de Sirius Red [Tullberg- Reinert y Jundt, 1999]: Las células se fijaron con solución fijadora de Bouin (ácido pícrico: formaldehído 35%: ácido acético glacial- 15:5:1) durante 1h. Se lavó la monocapa celular con ácido clorhídrico 0,1 N y se tiñó con una solución de Sirius Red por 1h. El material teñido se extrajo en 1 ml de hidróxido de sodio 0,1 N y se midió la absorbancia a 550 nm. Se

preparó una curva de calibración usando colágeno puro (Sigma-Aldrich). Los resultados obtenidos (μg de colágeno/ $100 \mu\text{g}$ de proteína) se expresaron como porcentaje (%) del basal. La proteína se determinó por el método de Bradford [Bradford, 1976].

- Mineralización: Los depósitos de calcio extracelular (nódulos de mineralización) se evaluaron luego de 21 días de cultivo en un medio de diferenciación osteoblástico. Luego de fijar con formalina y teñir con Rojo de Alizarina S [Ueno, 2001], el colorante adherido a los depósitos de calcio se extrajo con 1 ml de solución de hidróxido de sodio 0,1 N y la densidad óptica se midió a 548 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje (%) del basal (Figura II.2.).

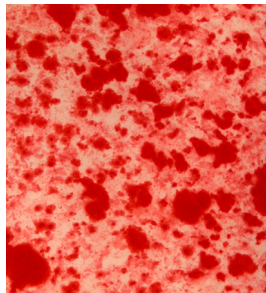


Figura II. 2. Aspecto de los nódulos de mineralización teñidos con Rojo de Alizarina.

II. 1. 3. Diferenciación adipogénica de CPMO.

Para diferenciar las CPMO a adipocitos las células fueron plaqueadas en platos de 24 pocillos y cultivadas hasta confluencia en DMEM – 10% SFB. Luego se les agregó durante 10 días DMEM – 10% SFB suplementado con rosiglitazona (Química Montpellier, Buenos Aires, Argentina) este compuesto es un ligando sintéticos de $\text{PPAR}\gamma$, y funcionan como potente inductor de adipogénesis o $0,5 \mu\text{M}$ 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU); $1 \mu\text{M}$ dexametasona (Decadron, Sidus, Argentina) que actúa como ligando de los receptores de glucocorticoide (GR) y mineralocorticoide (MR), cuya acción final es reprimir la expresión de Pref-1 (factor de preadipocitos 1, que es el principal factor de transcripción antiadipogénico) y activar $\text{PPAR}\gamma$, y 200nM insulina (Lilly, Buenos Aires Argentina) , que ejerce su efecto pro-adipogénico por medio de su vía normal de señalización, que incluye IRSs, PI3K y PKB/AKT. Finalmente, regula positivamente la expresión de $\text{PPAR}\gamma$ y C/EBP- α , aumentando la expresión de genes del fenotipo maduro, como los que intervienen en la captación de glucosa y en la lipogénesis. También tiene efectos antilipolíticos. Pasado este tiempo se analizaron los

depósitos intracelulares de triglicéridos y la acumulación de lípidos intracelulares [Morrison, 2000].

II. 1. 3. A. Determinación de parámetros de diferenciación adipocítica.

- Depósitos intracelulares de triglicéridos: Los depósitos intracelulares de triglicéridos fueron analizados por un kit enzimático comercial (Wiener, Rosario, Argentina). La monocapa celular fue solubilizada con 100 μ l de Tritón X-100 0,1%. De esta forma, las células se lisaron y fueron incubadas durante una hora con el buffer de reacción (de acuerdo con las instrucciones del kit) y la absorbancia fue medida a 505 nm. Alícuotas del mismo extracto fueron usadas para determinar la cantidad de proteína por la técnica de Bradford [Bradford, 1976].
- Tinción de Oil Red: El oil red es un colorante liposoluble utilizado para teñir lípidos neutros y algunas lipoproteínas. Se descarta el medio de cultivo; se lava la monocapa con PBS y luego se adiciona formalina durante 5 min. Se elimina el fijador y agrega nuevamente formalina durante 1 h. Luego se lava con isopropanol 60% y se deja secar completamente. Se agrega la solución de oil red durante 10 min y se lava con agua destilada. El colorante se puede extraer con isopropanol al 100% y medir la absorbancia del extracto a 500 nm. También se detectaron los depósitos intracelulares de lípidos en la monocapa al microscopio (Nikon Eclipse E400) y fotografiados con una cámara digital (Nikon Coolpix 4500).

II. 1. 4. Determinación de los niveles de expresión de proteínas por Western blot.

Las células progenitoras de médula ósea fueron crecidas hasta confluencia en platos de 6 pocillos en DMEM al 10% con SFB y luego diferenciadas a osteoblastos durante 15 y 21 días. Tanto las células sin diferenciar como diferenciadas fueron lisadas con buffer de Laemmli. Estos lisados fueron calentados a 100°C durante 1 minuto y 30 μ g de proteína fueron sembrados en un gel de poliacrilamida-bisacrilamida al 10-12% con SDS. Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE y fueron transferidas a una membrana de PVDF. Luego de lavar y bloquear durante 2 hs con leche al 5% en PBS-T las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios: anti- Runx2 (1:5000), anti- PPAR γ (1:7000), anti- p-AMPK (1:2500), anti - AMPK (1:2500), anti- calcitonina (1:2500) y anti- RAGE (1:5000). Después de lavar, las membranas fueron incubadas con el segundo anticuerpo durante 1 hs a

temperatura ambiente, en concentraciones que variaron desde 1:2500 a 1:7000. Luego fueron reveladas por el método de quimioluminiscencia. La intensidad de las bandas fue cuantificada con el programa Image J (<http://www.macbiophotonics.ca>) [Molinuevo, 2010].

II. 2. Estudios *in vivo*

II. 2. 1. Animales y tratamientos.

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos jóvenes (200 - 220 gr) mantenidas en un bioterio climatizado (23°C) con ciclos de luz-oscuridad de 12 hs, alimentados con alimento balanceado estándar y agua *ad libitum*. Todos los ensayos con animales fueron realizados de acuerdo a la Guía de Manejo y Uso de Animales de Laboratorio [Guidelines on the Handling and Training of Laboratory Animals. In: The Biological Council of Animal Reserch and Welfare Potters Bar, England: Universities Federation for Animal Welfare, 1992], bajo las condiciones establecidas en las normas bioéticas nacionales disposición ANMAT 5330/97- e internacionales. Asimismo, se tuvieron en cuenta las indicaciones de la guía del NIH para animales de experimentación (<http://grants.nih.gov/grants/olaw/olaw.htm>).

II. 2. 1. A. Experimento I: Efecto de drogas antidiabéticos.

Los animales fueron divididos en 4 grupos de 10 animales por grupo:

- Ratas control, (**C**), las cuales recibieron agua *ad libitum*.
- Ratas tratadas con metformina, (**M**), las cuales recibieron la droga en el agua de bebida a una concentración de 100mg/kg/día (Química Montpellier, Buenos Aires, Argentina), durante 2 semanas [Molinuevo, 2010].
- Ratas tratadas con rosiglitazona, (**R**), las cuales recibieron en el agua de bebida la droga en una concentración de 4 mg/kg/día (Química Montpellier, Buenos Aires, Argentina) [Wang, 2008].
- Ratas tratadas con ambas drogas, (**RM**), metformina y rosiglitazona, en las mismas concentraciones que en los grupos anteriores.

El tratamiento con las drogas duró 2 semanas. Al finalizar este período se extrajo sangre de los animales y se determinó la glucemia (por el método de la glucosa oxidasa) [Lott, 1975], trigliceridemia y colesterolemia utilizando kits comerciales.

II. 2. 1. B. Experimento II: Efecto de la Metformina en un modelo de Diabetes.

Los animales fueron divididos en cuatro grupos de 10 animales por grupo:

- Ratas controles no diabéticas (sin tratamiento) [C],
- Ratas controles no diabéticas tratadas durante 2 semanas con metformina en el agua de bebida (100 mg/kg/día) [M] (Química Montpellier, Buenos Aires, Argentina),
- Ratas con diabetes inducida por destrucción parcial de las células beta pancreáticas, sin tratamiento, [D].
- Ratas diabéticas tratadas 2 semanas con metformina (100 mg/kg/día) [DM].

La inducción de diabetes se realizó una semana antes de iniciar el tratamiento con metformina, por inyecciones intraperitoneales sucesivas de 75 mg/Kg de ácido nicotínico o nicotinamida (NA) y 60 mg/Kg de estreptozotocina (STZ) [Tahara A, 2008]. Antes de iniciar el tratamiento se tomaron muestras de sangre para confirmar el desarrollo de la enfermedad. Al finalizar todos los tratamientos se obtuvieron muestras de sangre para poder medir parámetros bioquímicos, luego de lo cual los animales fueron sacrificados por dislocación cervical bajo anestesia. Se evaluaron, empleando equipos comerciales, los siguientes parámetros séricos: glucemia (Wiener Lab, Argentina), triglicéridemia (Wiener Lab, Argentina), colesterolemia (Wiener Lab, Argentina), insulinemia (ELISA para insulina de rata, ALPCO, USA) y fructosamina (BioSystems, España). Asimismo mediante la técnica de ELISA se valoró la cantidad de la citoquina pro-inflamatoria $TNF\alpha$ (BD OptEIA™ Mouse TNF mono/mono).

Este modelo presenta diabetes con producción deficiente de insulina, hiperglucemia, triglicéridos y fructosamina aumentados en sangre.

- **Fundamento del modelo de diabetes insulino-deficiente.**

La STZ [2-deoxi-2(3-metil-3-nitrosoureido)-D-glucopiranososa, (Figura II. 2. 1) es una nitrosourea ampliamente usada para inducir diabetes experimental en animales. La potente acción diabetogénica de la STZ se debe a la lesión en las células β pancreáticas, las cuales son la única fuente de insulina. La STZ es relativamente selectiva para estas células e ingresa a través del transportador de glucosa GLUT2, sin embargo la fracción metil nitrosourea es la responsable de la toxicidad. Numerosos estudios *in vitro* han demostrado que la STZ produce alquilación del ADN produciendo la fragmentación de ADN en las células β pancreáticas. Como resultado del daño en el ADN, se activan mecanismos intracelulares de reparación del ADN, como por ejemplo la activación de la enzima poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1). Esta enzima nuclear cataliza la síntesis de poli ADP-ribosa a partir de dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD^+). Cuando el daño en el ADN es escaso, la activación de PARP-1 es beneficiosa. Sin embargo, el daño excesivo en el ADN producido por la STZ conduce a la hiperactividad de PARP-1 con la consiguiente disminución sustancial de su sustrato, NAD^+ .

El NAD^+ es una importante molécula implicada en el metabolismo energético celular. Una reducción severa de NAD^+ trae aparejada una disminución de ATP, ya que la biosíntesis del NAD^+ es ATP dependiente, lo cual lleva a la reducción de la síntesis de insulina y la muerte celular. Sin embargo, la disminución del ATP no resulta solo del incremento en la actividad de la PARP-1, sino que también se debe a que la STZ produce disfunción mitocondrial, reduciendo el consumo de oxígeno, y el potencial de membrana de la mitocondria.

La nicotinamida (NA) (piridina-3-carboxamida, (Figura II.2.1) es una amida proveniente de la vitamina B3 (niacina). La citotoxicidad producida por la estreptozotocina es atenuada por la nicotinamida, uno de los componentes del NAD^+ , el cual inhibe a la enzima poli ADP-ribosa sintetasa y en consecuencia previene la depleción del NAD^+ en las células pancreáticas, así como también cumple la función de proveer NAD^+ . En mamíferos el NAD^+ es sintetizado a partir de NA y su formación está catalizada por dos enzimas: nicotinamida fosforil transferasa (Namp1) y nicotinamida/ ácido nicotínico mononucleótido adeniltransferasa (Nmnat) [Szkudelski, 2012].

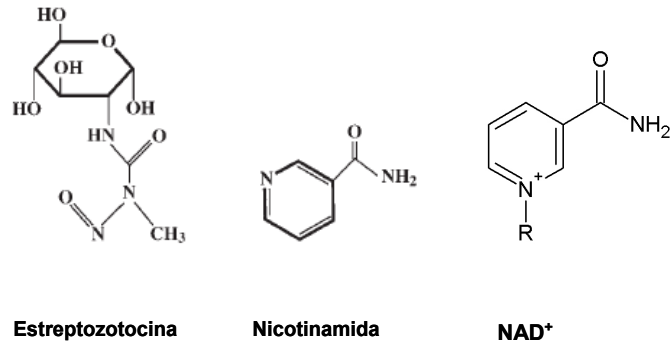


Figura II. 2. 1. Estructura química de estreptozotocina, nicotinamida y NAD⁺. [Szkudelski, 2012].

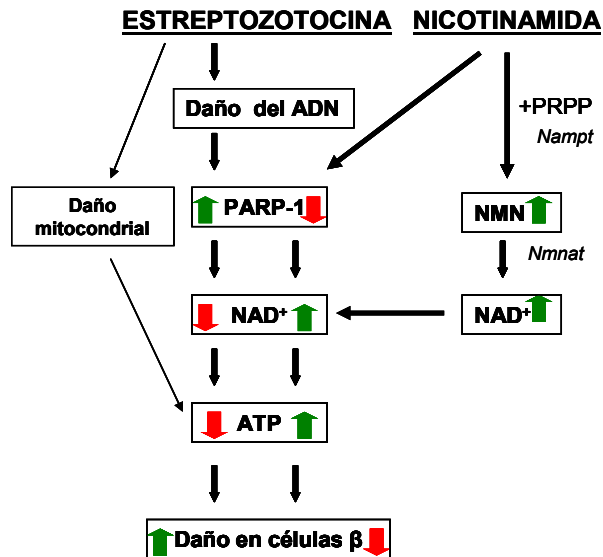


Figura II. 2. 2. Representación esquemática de la acción citotóxica de la STZ y el efecto protector de la NA. [Szkudelski, 2012].

II. 3. Análisis Histomorfométrico

II. 3. A. Obtención de las muestras para histomorfometría del hueso

Se diseccionaron los fémures de cada rata para analizar la microarquitectura metafisaria. Los huesos se fijaron en formalina neutra tamponada (NBF) durante 72 hs y luego se descalcificaron en sucesivos lavados con una solución de EDTA (Biopack, Buenos Aires, Argentina) 10 %, pH = 7,0 durante aproximadamente 3 semanas a temperatura ambiente. Las muestras fueron incluidas en parafina. Para llegar a incluir los fémures en parafina se usó un tren de deshidratación formado por dos pasajes sucesivos de 1h de duración en cada uno de los siguientes solventes: alcohol 70°, alcohol 96°, alcohol 100° xileno y finalmente parafina I y parafina II. Se hicieron cortes de 5 µm de espesor con un micrótopo Leica SM 2000 R, los cortes se recogieron en un baño de flotación y se los dejó secar durante 48 hs a 56°C.

Los cortes de los preparados embebidos en parafina se sumergieron en xilol para eliminar la parafina, luego se pasaron por una serie de alcoholes (100°, 96° y 70°) para rehidratarlos, y a continuación se realizaron las siguientes coloraciones:

- Hematoxilina - Eosina (H - E).
- Histoquímica de fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP).
- Azul Alcían.

a) Tinción con Hematoxilina - Eosina. La hematoxilina es un colorante catiónico o básico, y por esta razón tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y violáceo, como por ejemplo los núcleos celulares. El colorante eosina tiñe componentes básicos (acidófilos) en tonos de color rosa (gracias a su naturaleza aniónica o ácida), como la mayoría de las proteínas al pH de la tinción. Los cortes desparafinados e hidratados se sumergieron en hematoxilina por 5 minutos, se lavaron con agua corriente, luego se introdujeron en eosina por 30 segundos y finalmente se lavaron con agua destilada. Posteriormente se pasaron por una serie de alcoholes (70°, 96° y 100°) para deshidratarlos, se los introdujo en xilol y finalmente se montaron con bálsamo sintético para montaje (Biopur, Argentina).

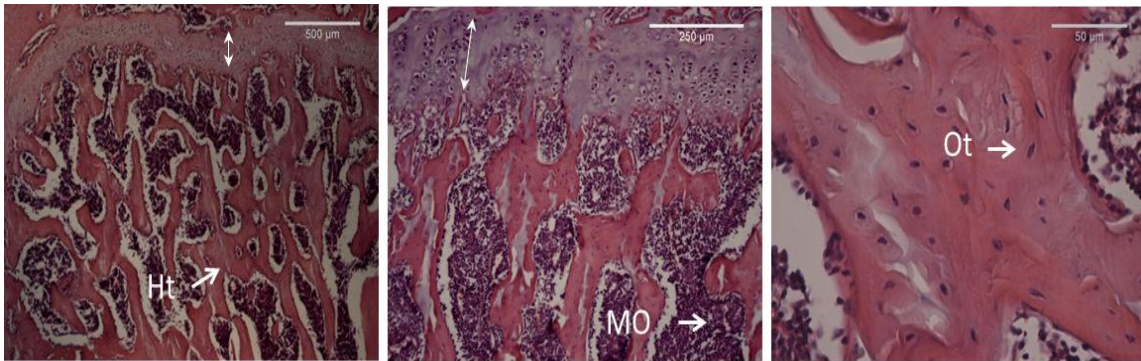


Figura III. 3.1. Imágenes de cortes histológicos teñidos con Hematoxilina y Eosina, a diferentes aumentos. Ot: Osteocito; MO: medula ósea; Ht: hueso trabecular. Cartílago de crecimiento doble flecha.

b) Tinción histoquímica para fosfatasa ácida tartratoresistente (TRAP). En los cortes histológicos se determinó la presencia de células con actividad positiva de fosfatasa ácida tartrato resistente. La reacción involucra una sustitución nucleofílica con un reactivo acoplante en la cual se forma un precipitado violáceo en las células que presentan actividad TRAP. Para esto se preparó una solución que contiene Fast Garnet GBC en Metilglicol acidificada con HCl, a la cual se le agregó nitrito de sodio gota a gota y a temperatura ambiente para producir la diazotación que permitirá formar la sal de diazonio altamente reactiva que será sustituida con el α -naftol liberado por la enzima a partir de naftol AS-BI. La reacción enzimática se lleva a cabo en presencia de tartrato de sodio para aumentar la especificidad de la reacción, en buffer citrato pH 4,9. Recién a partir de este momento se pusieron los cortes ya desparafinados e hidratados en la solución termostatzada durante 60 minutos a 37°C. Luego se lavaron con agua destilada, se contra colorearon con Fast Green durante 10 minutos, se enjuagaron con agua destilada y se montaron los preparados en glicerina.

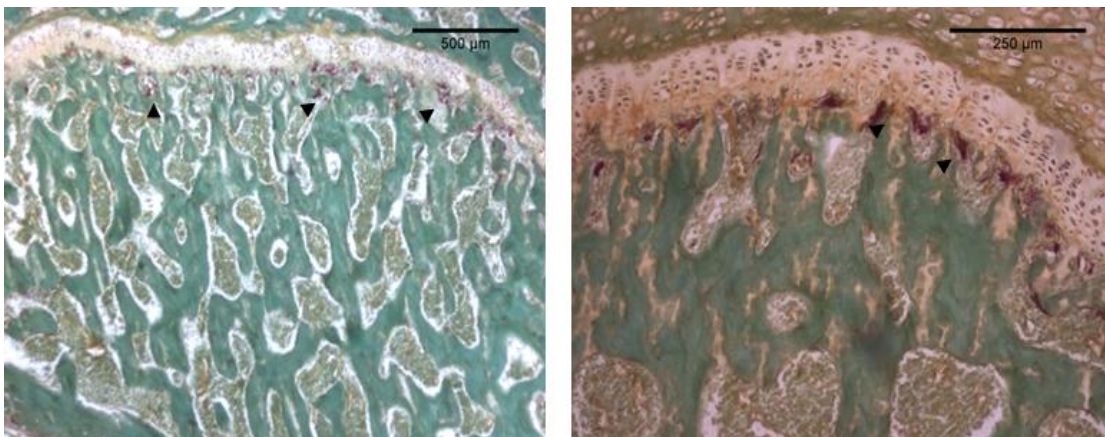


Figura III. 3. 2. Imágenes de cortes histológicos teñidos utilizando la histoquímica de TRAP, a diferentes aumentos. Las flechas indican la zona TRAP+

c) Tinción de Azul Alcían pH 2.5. A este pH, el azul alcían tiñe las mucinas altamente sulfatadas sintetizadas por los condrocitos de la placa de crecimiento, las cuales se van a ver de color azul. Los cortes desparafinados e hidratados se tiñeron con solución de Azul Alcían durante 4 hs. Luego se lavaron con agua corriente durante 10 minutos. Los preparados se contracoloraron con Eosina (30 segundos). Posteriormente se pasaron por una serie de alcoholes (70°, 96° y 100°) para ser deshidratados, se los introdujo en xilol y finalmente se montaron con bálsamo sintético.

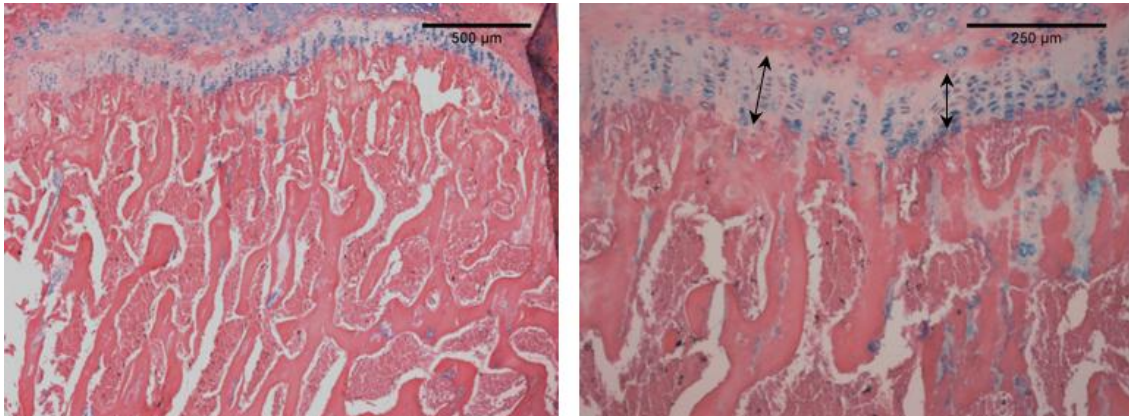


Figura III. 3. 3. Imágenes de cortes histológicos teñidos con Azul Alcían, a diferentes aumentos. Las flechas indican la placa de crecimiento.

Una vez teñidos, los preparados fueron fotografiados con una cámara digital Nikon Coolpix 4500 en un microscopio Nikon Eclipse E400. Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ (<http://www.macbiophotonics.ca>) utilizando un plugin para incorporar una escala micrométrica.

II. 3. B. Histomorfometría ósea

En las imágenes fotográficas de cortes teñidos con H-E, se determinó el área de hueso trabecular en la esponjosa primaria femoral, definido como: área trabecular sobre área total (trabéculas más médula ósea). Los resultados se expresaron como porcentajes (%).

Se calculó la densidad osteocítica contando el número de osteocitos por unidad de área de hueso trabecular. Los resultados se expresaron como número de osteocitos/mm².

Usando imágenes de histoquímica de fosfatasa ácida tartrato resistente, se calculó el área con actividad TRAP/área total de hueso en los 250 µm proximales al cartílago de crecimiento.

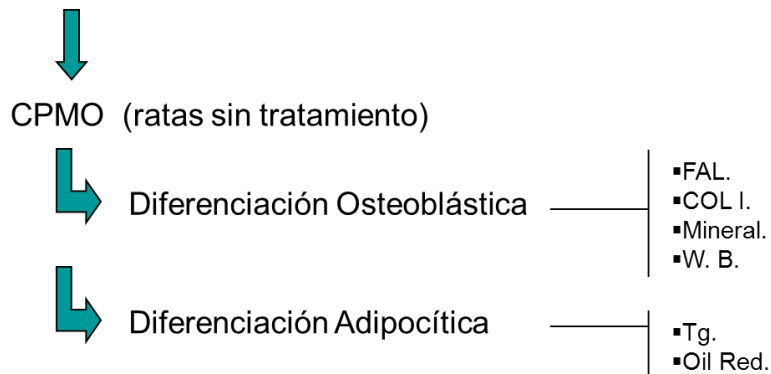
En las fotos de la tinción de Azul Alcían se cuantificó la altura del cartílago de crecimiento.

II. 4. Análisis estadístico

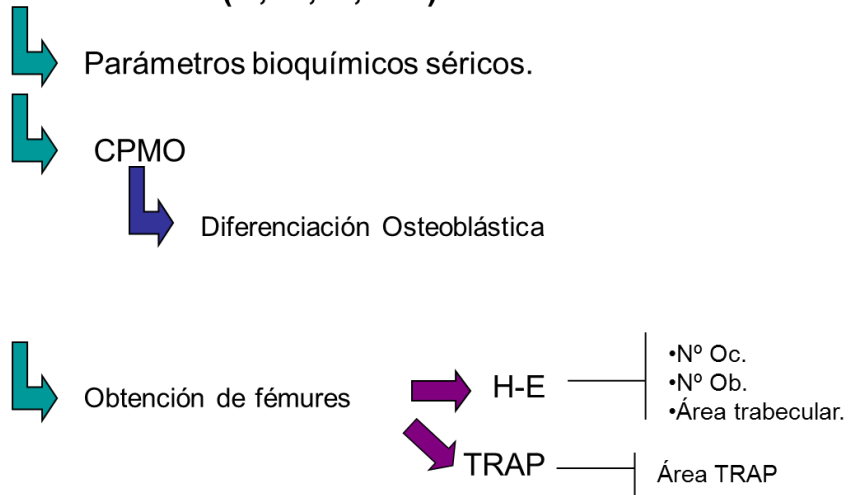
Los resultados se expresan como la media \pm SEM y se obtienen a partir de al menos tres experimentos independientes que se realizan por triplicado. Las diferencias entre grupos se establecen mediante Oneway ANOVA con test Tukey post-hoc. Para datos con distribución no normal se utiliza el test no paramétrico Kruskal Wallis con test de Dunn post-hoc, usando el programa estadístico GraphPad In Stat version 3.00 (Graph Pad Software, San Diego, California, USA). Se considera significativo $p < 0,05$.

Diseño experimental

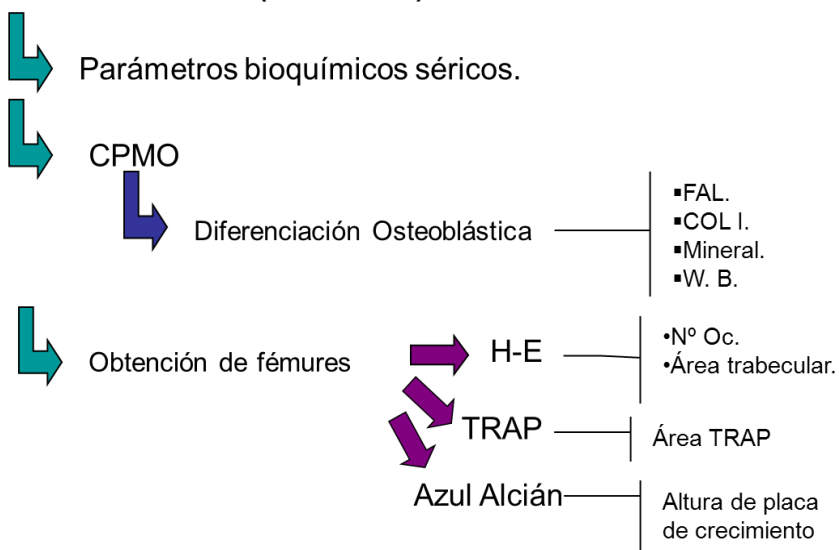
Obtención de CPMO



Primer modelo animal (C; M; R; RM)



Segundo modelo animal (C;M;D;DM)



R E S U L T A D O S



III. 1. Efecto de la metformina sobre la diferenciación de células progenitoras de médula ósea.

III. 1. 1. Estudios *in vitro*.

Efecto directo de la metformina sobre la diferenciación osteoblástica.

En la primera parte de este trabajo, se evaluó el efecto directo *in vitro* de la metformina sobre la capacidad osteogénica de células progenitoras de médula ósea (CPMO). Para ello, las células aisladas de ratas sin tratamiento fueron cultivadas en medio osteogénico adicionado con concentraciones crecientes de metformina (0,5 a 10 μM), empleando como dosis máxima aquella equivalente a la concentración plasmática observada en pacientes diabéticos tratados con esta droga (10 μM). Luego de 15 días de cultivo se evaluó la actividad de la fosfatasa alcalina y el depósito de colágeno tipo I, encontrando que la metformina incrementó significativamente, en forma dosis dependiente, ambos parámetros (Figura.III.1.1 y Figura III.1.2).

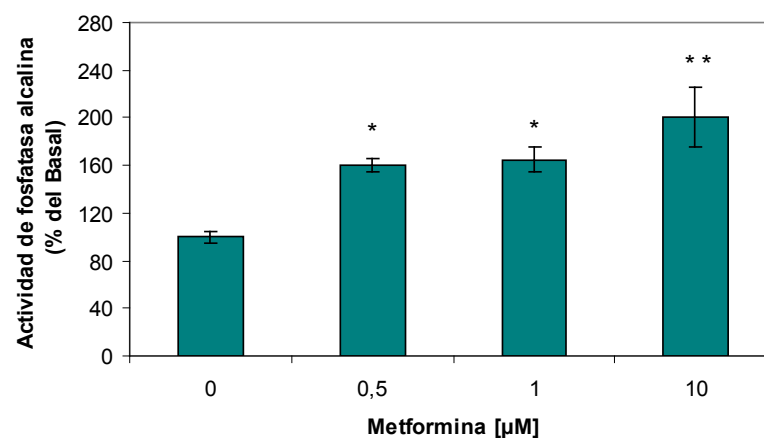


Figura III. 1. 1. Actividad de Fosfatasa Alcalina en células progenitoras de médula ósea diferenciadas a osteoblastos. Las CPMO fueron diferenciadas durante 15 días en DMEM-10% SFB, suplementado con 25 $\mu\text{g/ml}$ de ácido ascórbico y 5 mM de β -glicerofosfato. Transcurrido este tiempo se determinó la actividad de fosfatasa alcalina expresándola como porcentaje respecto al basal (0 μM metformina = 4.2 ± 0.5 nmol p-nitrofenol/mg proteína por minuto). Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs basal.

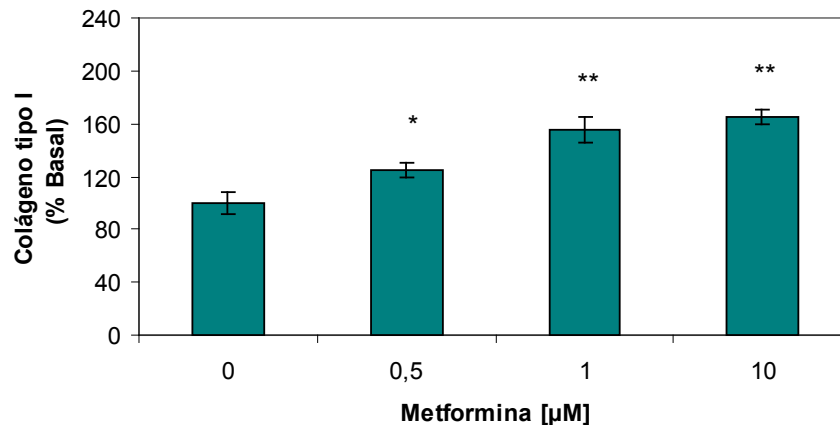


Figura III. 1. 2. Producción de Colágeno tipo I en células progenitoras de médula ósea diferenciadas a osteoblastos. Las CPMO fueron diferenciadas durante 15 días en medio de diferenciación osteoblástico. Luego de este tiempo se determinó la producción de colágeno tipo I, expresándola como porcentaje respecto al basal (0 μM metformina = $4.2 \pm 0.02 \mu\text{g}$ colágeno/mg proteína). Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs basal.

Luego de 21 días de diferenciación osteogénica se evaluó la producción de nódulos de mineralización, observándose el mismo comportamiento. Los depósitos extracelulares de calcio se incrementaron en forma dosis dependiente, obteniéndose los mayores depósitos de mineral para la concentración 10 μM de metformina (160 ± 18 % del basal) (Figura III.1.3).

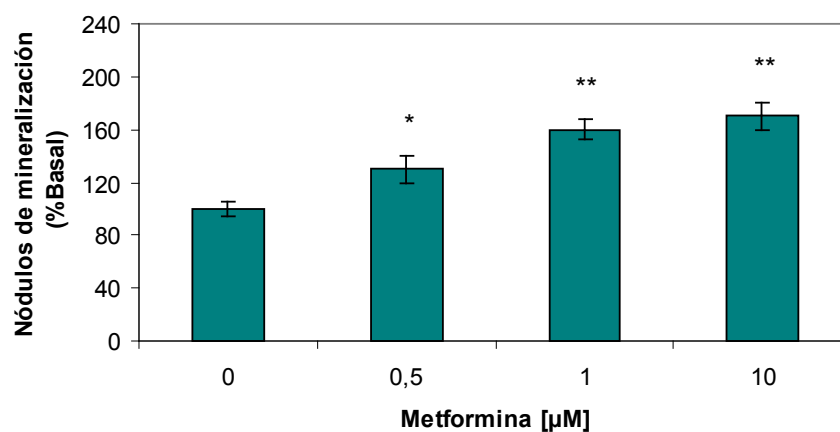


Figura III. 1. 3. Producción de nódulos de mineralización en células progenitoras de médula ósea diferenciadas a osteoblastos. Luego de 21 días de diferenciación, se determinó la producción extracelular de nódulos de mineralización, utilizando la técnica de rojo de alizarina. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs basal.

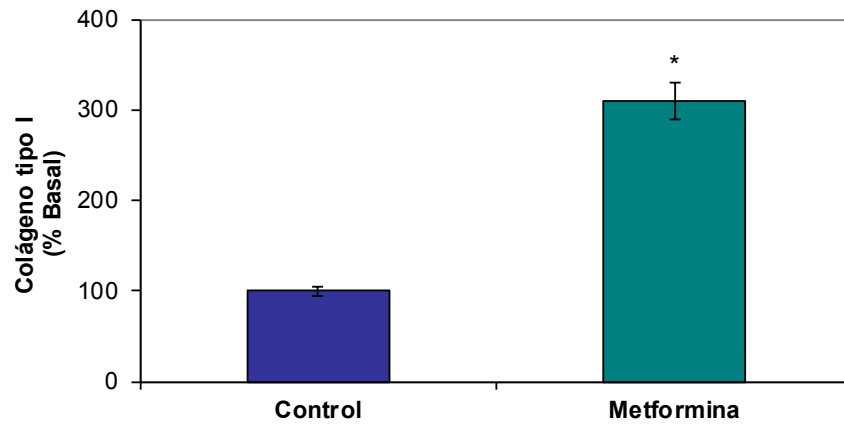
III. 1. 2. Estudios *ex vivo*

III. 1. 2. A. Efecto de la administración *in vivo* de metformina sobre la capacidad *ex vivo* de diferenciación osteoblástica de las CPMO.

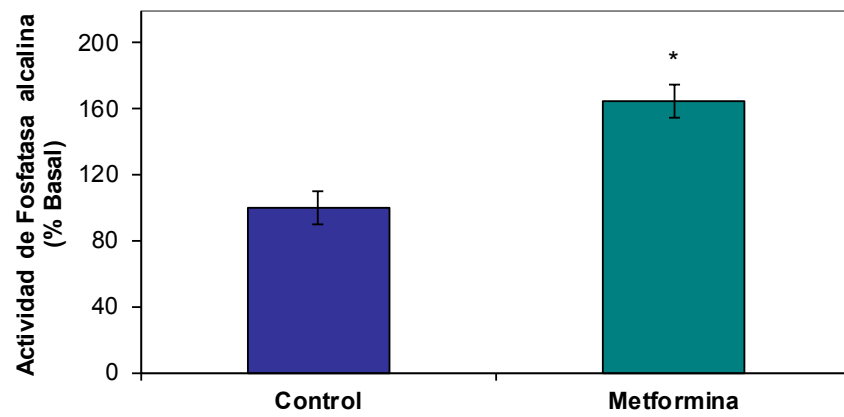
Para evaluar el efecto *ex vivo* del tratamiento oral con metformina sobre el potencial osteogénico de las CPMO se contó con dos grupos de ratas: controles (C), y tratadas con metformina (M) 100 mg/kg/día en el agua de bebida. Los animales fueron sacrificados luego de 2 semanas de tratamiento, y se obtuvieron las CPMO como se describe en materiales y métodos. Transcurridos 15 ó 21 días de cultivo en medio de diferenciación osteogénico, se analizaron los siguientes parámetros del linaje osteoblástico: síntesis de colágeno tipo I y actividad de fosfatasa alcalina, o producción de nódulos de mineralización, respectivamente.

Encontramos que luego de 15 días de diferenciación, tanto la actividad de fosfatasa alcalina como la producción de colágeno tipo I aumentaron significativamente en las células provenientes de ratas tratadas con metformina respecto a las células provenientes de ratas control (Figura III.1.4.B y Figura III.1.4.A). Además, luego de 21 días de diferenciación osteogénica la formación de nódulos de mineralización se encontró significativamente incrementada (Figura III.1.4.C).

A



B



C

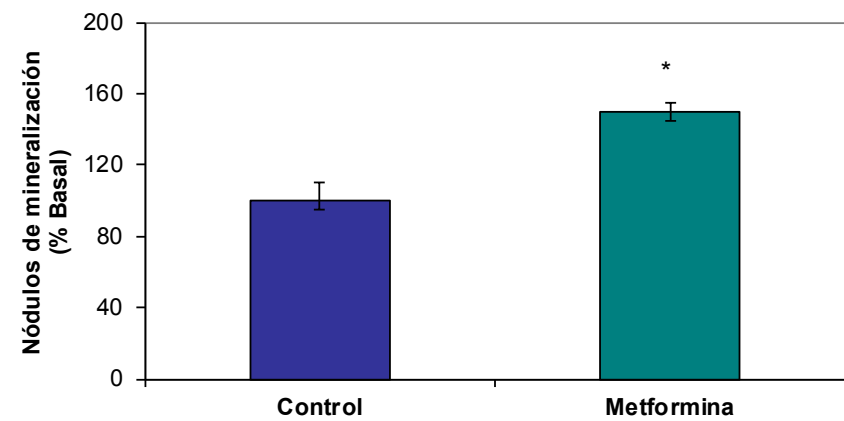


Figura III. 1. 4. Efecto *ex vivo* de la metformina sobre el potencial osteogénico de las CPMO. Producción de colágeno tipo I (A) y la actividad de FAL (B) y depósitos de mineral (C). Los resultados se expresaron como porcentaje respecto al basal \pm SEM. * $p < 0,05$.

También se analizó la expresión de osteocalcina, marcador de maduración osteoblástica, en ambos grupos de ratas luego de 21 días de diferenciación en un medio osteogénico. La Figura III.1.5 muestra que la expresión de osteocalcina se encuentra significativamente aumentada en el grupo tratado con metformina respecto al control.

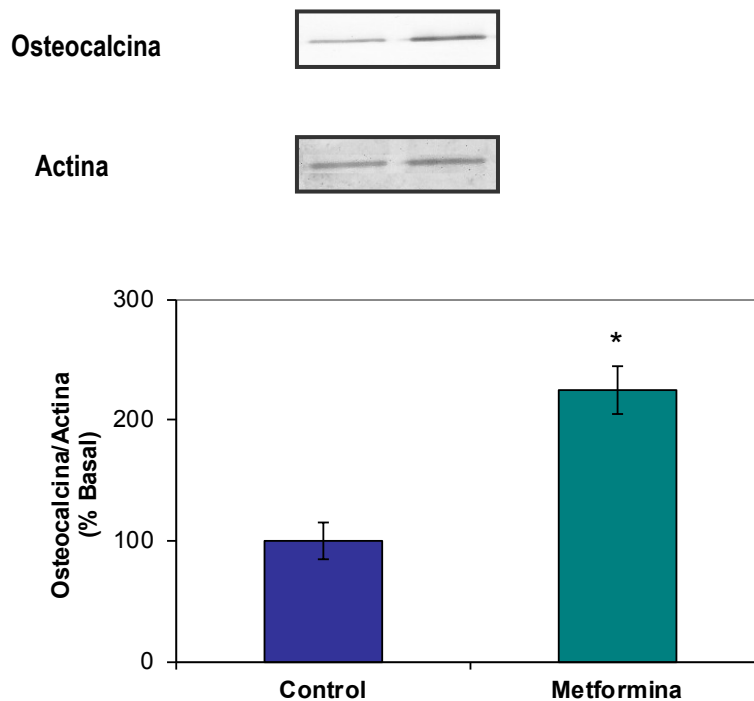


Figura III. 1. 5. Efecto *ex vivo* de la metformina sobre el potencial osteogénico de las CPMO. Luego de 21 días de diferenciación osteoblástica se determinó la expresión de osteocalcina. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto al basal \pm SEM. * $p < 0,05$.

III. 1. 2. B. Efecto del tratamiento con metformina sobre factores de transcripción osteoblásticos y adipogénicos.

Con el fin de evaluar la expresión de diferentes factores de transcripción, las CPMO provenientes de ratas controles y tratadas con metformina, fueron aisladas y cultivadas en un medio adecuado por diferentes períodos de tiempo. La expresión del factor de transcripción osteogénico Runx2 fue evaluado por Western Immunoblot. La cuantificación densitométrica de las bandas obtenidas mostró que las células provenientes de las ratas tratadas con metformina expresaron niveles significativamente mayores de Runx2 en función del tiempo de cultivo, comparadas con sus correspondientes controles (Fig III. 1. 6).

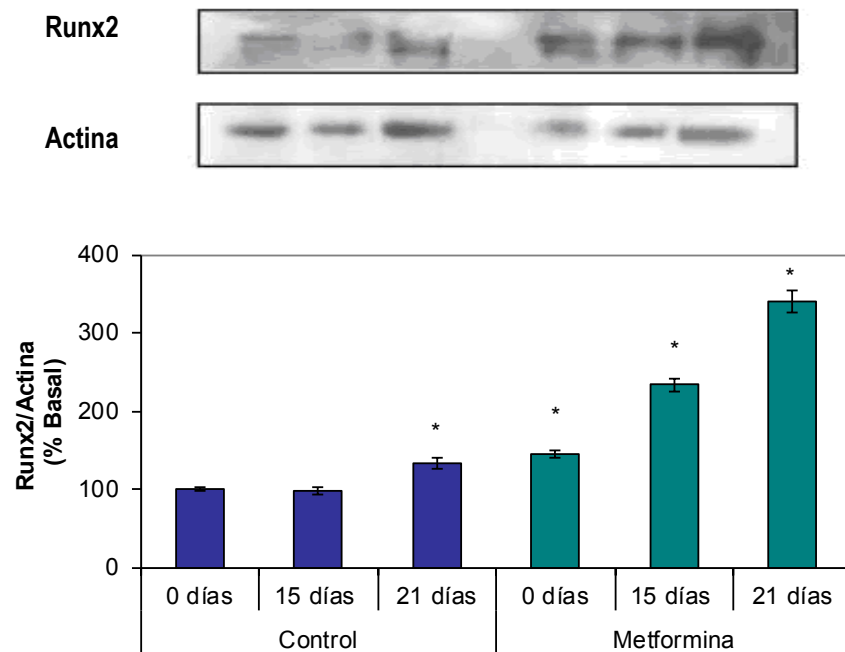


Figura III. 1. 6. Expresión de Runx2 en CPMO provenientes de ratas control y ratas tratadas con metformina. Las células fueron diferenciadas a osteoblastos durante los períodos de tiempo especificados en el gráfico. Las bandas fueron cuantificadas con el programa ImageJ y los resultados fueron normalizados contra el valor correspondiente de actina. Los valores se expresan como porcentaje respecto al basal \pm SEM. * $p < 0,05$.

Se estudió además la capacidad adipogénica de las CPMO. Para ello se analizaron los niveles de expresión del factor de transcripción adipogénico PPAR γ luego de 10 días de cultivo en un medio de diferenciación adipogénica. Como puede observarse en la Figura III.1.7, los niveles de PPAR γ fueron comparables en ambos grupos experimentales.

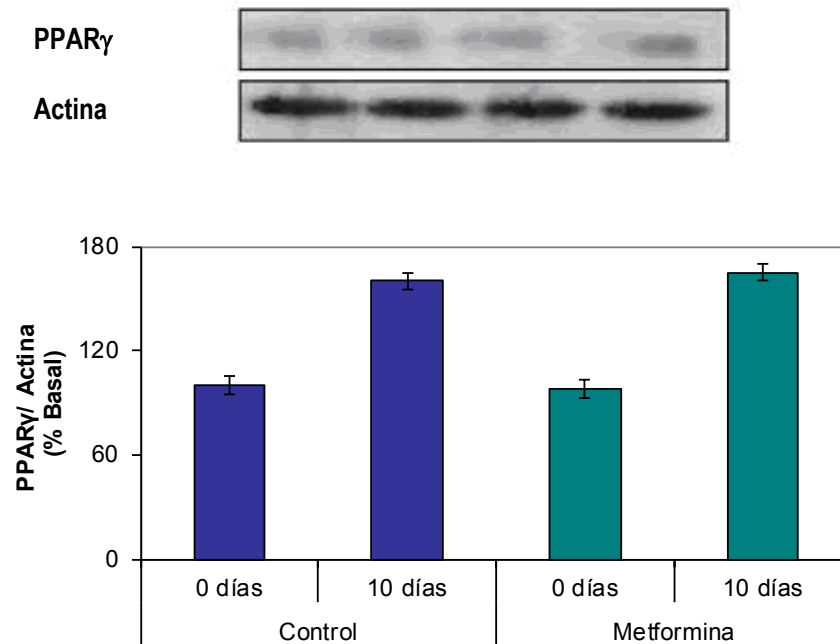


Figura III. 1. 7. Expresión de PPAR γ en CPMO provenientes de ratas control y ratas tratadas con metformina. Las células fueron diferenciadas a adipocitos durante 10 días. Los resultados fueron normalizados con el valor correspondiente de actina y se expresaron como porcentaje respecto al basal \pm SEM.

III. 1. 2. C. Efecto de la metformina sobre la activación de la AMPK en las CPMO.

La AMPK es una proteína que funciona como sensor metabólico de la energía celular, la cual se activa en situaciones de estrés celular. La activación de AMPK inhibe la producción de glucosa hepática, mejora la sensibilidad e induce la oxidación de ácidos grasos, y en músculo esquelético promueve la internalización de la glucosa. La AMPK puede ser activada por ejercicio físico, hormonas citoquinas y drogas. Además, se sabe que la metformina activa a la proteína AMPK para ejercer su acción antidiabética [Andujar-Pala, 2012]. En base a estos conocimientos se investigó el posible mecanismo de transducción de señales involucrado en la acción de la metformina en CPMO. Se evaluó el efecto directo *in vitro* y *ex vivo* de esta droga sobre la activación de AMPK.

Primero se estudió el efecto directo de 100 μ M de metformina sobre la activación de la AMPK en las CPMO derivadas de ratas controles. Se encontró que la metformina incrementó significativamente los niveles de fosforilación de la AMPK luego de una hora de tratamiento sin

modificar los niveles totales de AMPK (Figura III.1.8). Debido a que la AMPK ejerce su acción tanto en núcleo como en citoplasma [Li Gong, 2012], se evaluó su localización por inmunofluorescencia. Se observó que la AMPK total se localizaba en el núcleo y en el citoplasma, tanto en células no tratadas como en células que fueron expuestas a la metformina. La intensidad de fluorescencia asociada a la AMPKt fue similar en ambas condiciones experimentales. Sin embargo, la metformina incrementó significativamente la fluorescencia asociada a p-AMPK, en el citoplasma y en el núcleo. El análisis semicuantitativo de la fluorescencia asociada a p-AMPK mostró que las células tratadas con metformina presentaban un aumento de la misma en ambas localizaciones celulares (1,5 veces respecto a células no tratadas; Figura III.1.8.A).

Los resultados obtenidos por inmunofluorescencia fueron confirmados por Western blot luego de incubar durante 1h, con y sin 100 μ M de metformina, células progenitoras de médula ósea provenientes de ratas controles. Se observó un incremento significativo de 1,6 veces en la relación p-AMPK : AMPKt en las células que estuvieron incubadas en presencia de metformina respecto del control (Figura III.1.8.B).

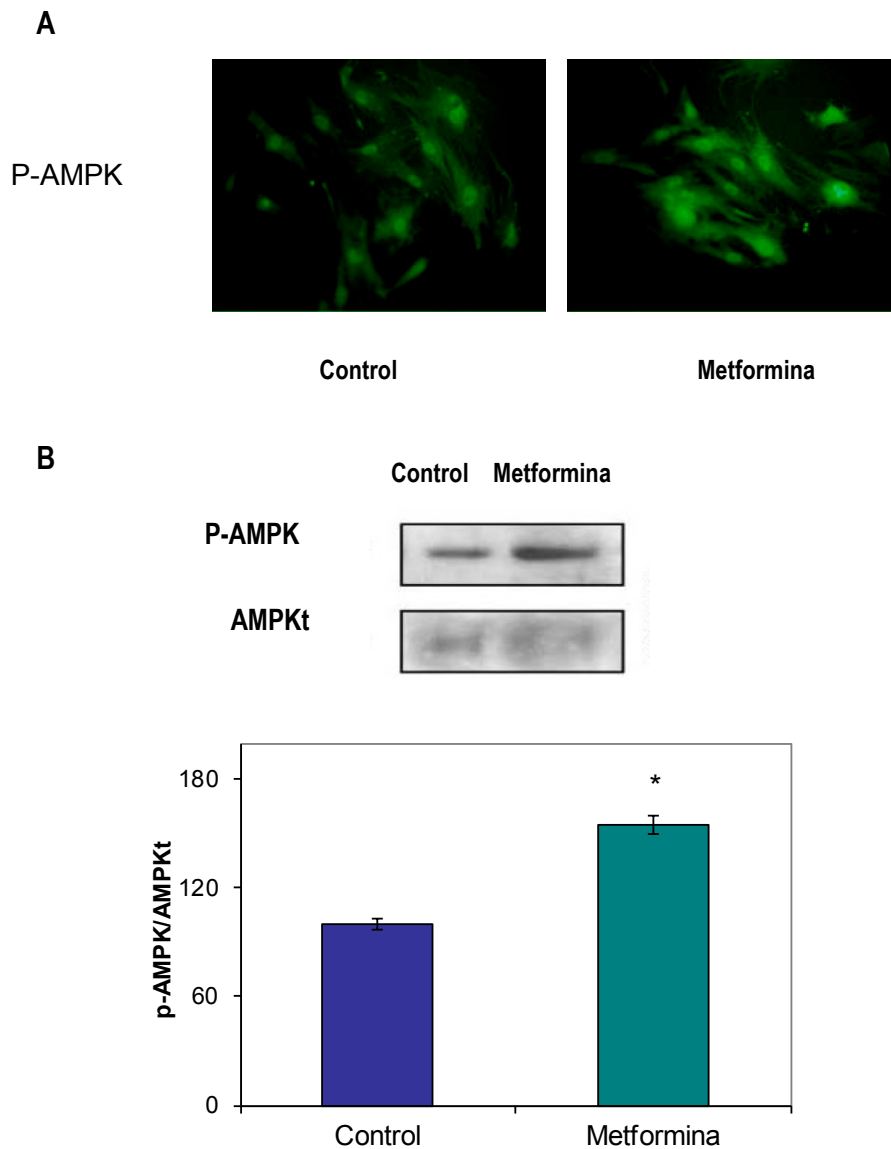


Figura III. 1. 8. Efectos *in vitro* de la metformina en la activación de la AMPK en CPMO. Las CPMO fueron aisladas de ratas controles y luego de llegar a confluencia fueron ayunadas durante 2 hs. Transcurrido este tiempo fueron incubadas por 1 hs en presencia o ausencia de 100 μ M de metformina. A continuación las células fueron procesadas para inmunofluorescencia (**A**) o para Western blot (**B**). * $p < 0,05$

Para evaluar si la fosforilación de la AMPK mediada por metformina se conservaba en las células provenientes de los dos grupos experimentales (CPMO de ratas tratadas con y sin metformina), se las cultivó en un medio de diferenciación osteogénico durante 0, 15 y 21 días. Posteriormente se evaluó la activación de AMPK mediante el análisis de las formas fosforilada y total mediante Western blot. Los cultivos *ex vivo* mostraron una diferencia significativa en la

activación de AMPK (2,8 veces respecto del control) luego de 21 días de cultivo en medio osteogénico. Sin embargo, esta diferencia no se observó luego de 0 ó 15 días. (Figura III.1.9)

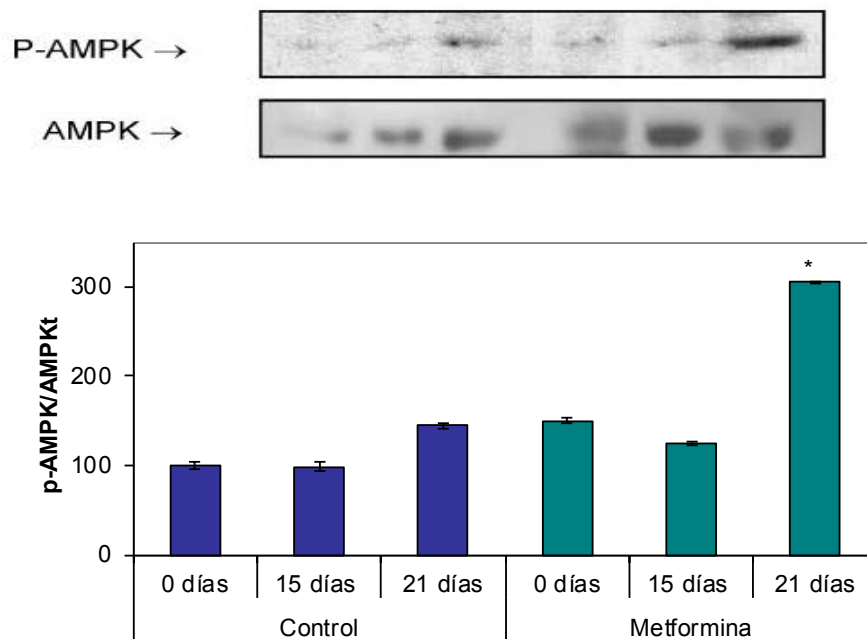
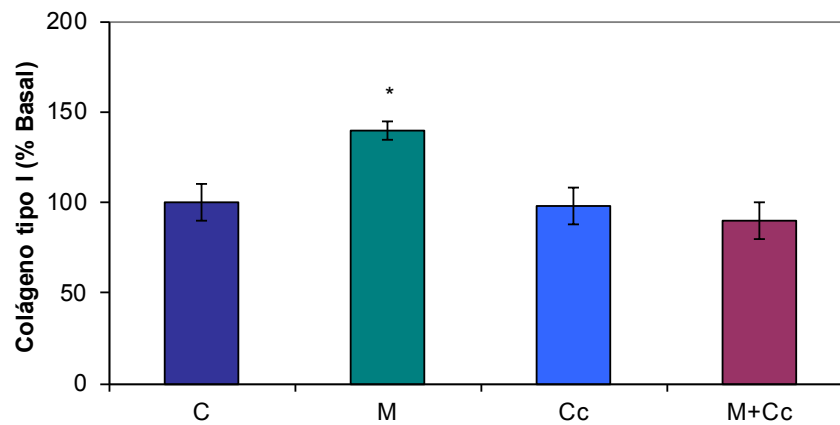


Figura III. 1. 9. Relación p-AMPK : AMPK en CPMO provenientes de ratas control y ratas tratadas con metformina luego de diferentes períodos de diferenciación osteoblástica. Las CPMO aisladas de ratas controles y de ratas tratadas con metformina fueron cultivadas en medio de diferenciación osteogénico durante 0, 15 y 21 días. Al finalizar este período los extractos celulares fueron procesados por Western blot para evaluar la expresión de las proteínas p-AMPK y AMPKt. * $p < 0,05$ vs control.

Luego, para demostrar que la metformina activa la AMPK, se procedió a incubar células provenientes de ratas controles (sin tratamiento) en medio osteogénico, en ausencia o presencia de $100\mu\text{M}$ de metformina y/o $0,5\mu\text{M}$ de compuesto C, un inhibidor de la activación de la AMPK, durante 15 días. Transcurrido este tiempo, se analizó la producción de colágeno tipo I y la relación p-AMPK : AMPKt por Western blot (Figura III.1.10). Se encontró que la metformina incrementó significativamente la producción de colágeno tipo I y la relación p-AMPK : AMPKt; mientras que la co- incubación de metformina con el compuesto C suprimió estos efectos (Figura III.1.10).

A



B

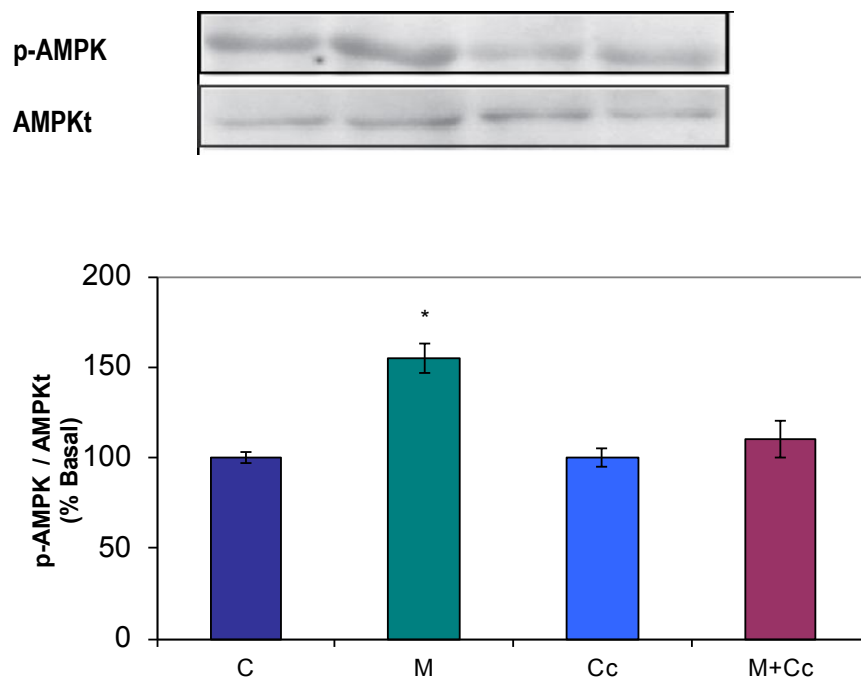


Figura III.1.10. Relación p-AMPK: AMPK en CPMO controles tratadas in vitro con metformina (M), compuesto C (Cc) y metformina + compuesto C (M+Cc). Las CPMO provenientes de ratas controles, fueron diferenciadas a osteoblastos en presencia o ausencia de 100 μ M de Metformina y/o 0,5 μ M de compuesto C (inhibidor de la forforilación de la proteína). Se evaluó la producción de colágeno tipo I (**A**) y la expresión de p-AMPK y AMPKt por Western blot (**B**). * $p < 0,05$ vs C.

III. 2. Efectos de la rosiglitazona y del co-tratamiento rosiglitazona-metformina.

III. 2. 1. Estudios *in vitro*.

Efectos de la rosiglitazona y del co-tratamiento rosiglitazona-metformina en la diferenciación adipocítica.

Como se describió en la introducción de este trabajo, la rosiglitazona es un ligando sintético del PPAR γ un factor de transcripción implicado en la activación de genes específicos del metabolismo lipídico y la diferenciación adipocítica. En los siguientes ensayos se determinó el efecto de la metformina sobre la diferenciación adipogénica inducida por rosiglitazona en células progenitoras de médula ósea. Para esto, se tomaron células provenientes de ratas sin tratamiento, las cuales fueron diferenciadas a adipocitos en ausencia o presencia de metformina (1 μ M y 10 μ M), empleando rosiglitazona 0,5 μ M como inductor adipocítico. Se encontró que la rosiglitazona indujo la acumulación de depósitos intracelulares de lípidos visualizados por la técnica de oil red, mientras que la metformina produjo una disminución del efecto de la rosiglitazona, el cual fue dependiente de su dosis (Figura III.2.1 y Figura III.2.2).

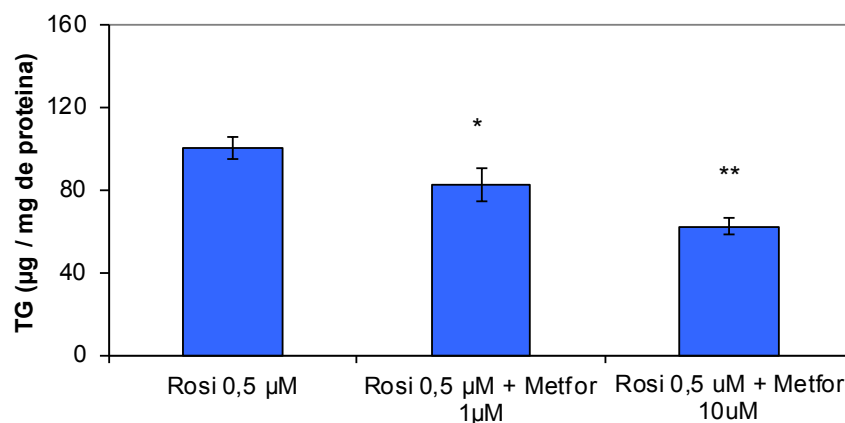
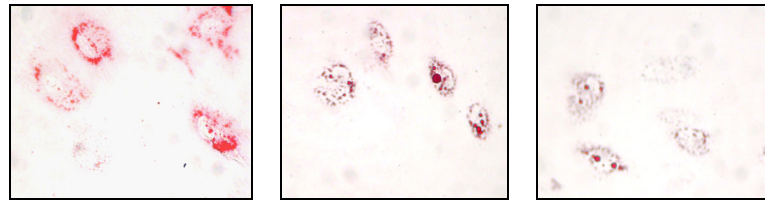


Figura III. 2. 1. Efecto *in vitro* de la metformina y la rosiglitazona sobre la diferenciación adipocítica de CPMO. Las CPMO fueron cultivadas durante 10 días en DMEM – 10% SFB suplementado con rosiglitazona, 1 μ M dexametazona como inductores de adipogénesis en presencia o ausencia de dosis crecientes de metformina. Contenido basal de triglicéridos (0 μ M metformina) = 178 ± 6 μ g/ mg proteína. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto al basal \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$



Rosiglitazona 5µg/ml	+	+	+
Metformina 1 µM	-	+	-
Metformina 10 µM	-	-	+

Figura III. 2. 2. Efecto *in vitro* de la metformina y la rosiglitazona sobre la diferenciación adipocítica de CPMO. Depósitos de lípidos teñidos por la técnica de oil red y observados al microscopio óptico (aumento 10X).

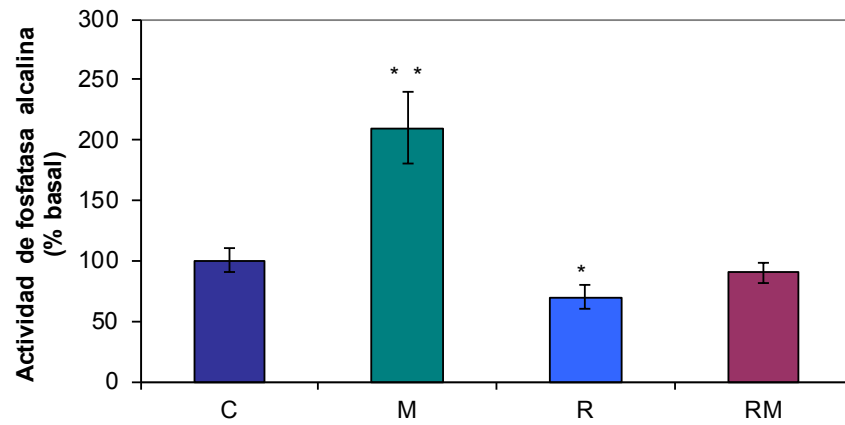
III. 2. 2. Estudios *ex vivo*.

III. 2. 2. A. Efectos de la rosiglitazona y del co-tratamiento con metformina sobre la capacidad osteogénica de CPMO.

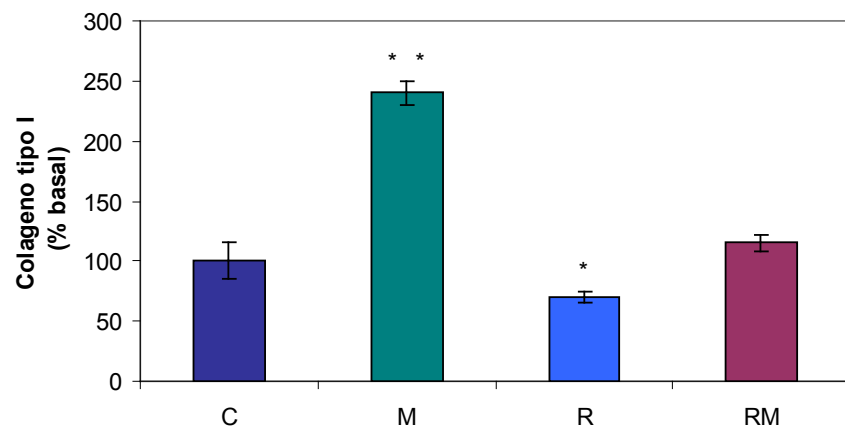
En base a los conocimientos previos del efecto de la metformina y la rosiglitazona *in vitro* y del efecto de la metformina *ex vivo*, se evaluó el efecto del tratamiento oral con rosiglitazona y metformina, solos o en combinación, sobre la diferenciación osteoblástica de las células progenitoras de médula ósea. Para esto se contó con cuatro grupos de ratas: el grupo control (C, sin tratamiento), y los grupos, metformina (M, 100 mg/kg día), rosiglitazona (R, 4 mg/kg día) y rosiglitazona + metformina (RM) a los cuales se les suministró la droga en el agua de bebida como se describe en materiales y métodos. Luego del sacrificio de los animales, se extrajeron las células de médula ósea, las cuales fueron cultivadas en medio de diferenciación osteogénico durante 15 y 21 días. Al finalizar estos períodos, se determinó la actividad de fosfatasa alcalina, la producción de colágeno tipo I y los depósitos extracelulares de mineral.

El tratamiento con rosiglitazona produjo una disminución significativa en todos los parámetros estudiados, mientras que el co-tratamiento con metformina previno totalmente el efecto de la rosiglitazona, llevando los valores a niveles similares a los del control. Como describimos previamente, el tratamiento con metformina produjo un incremento significativo en todos los parámetros (Figura III.2.3).

A



B



C

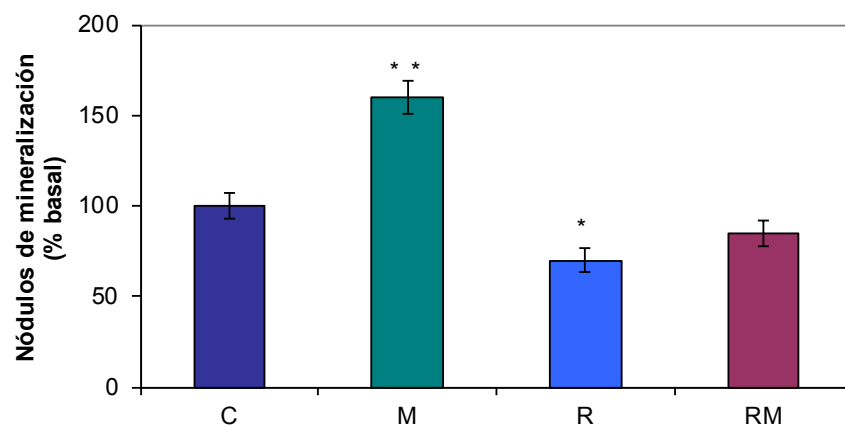


Figura III. 2. 3. Efectos *ex vivo* de la metformina y la rosiglitazona en la diferenciación osteoblástica de CPMO. Se evaluó la actividad específica de fosfatasa alcalina (A) y la producción de colágeno tipo I (B), y luego de tres semanas, la producción de nódulos de mineralización (C). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs C.

III. 2. 2. B. Efectos de la rosiglitazona y del co-tratamiento rosiglitazona-metformina sobre la expresión de factores de transcripción osteoblásticos y adipocíticos.

En este capítulo se evaluó el efecto del co-tratamiento rosiglitazona - metformina sobre los factores de transcripción adipocíticos y osteoblásticos. Runx2 es el factor de transcripción más importante durante la diferenciación y maduración osteoblástica; mientras que PPAR γ lo es para la diferenciación adipocítica. Analizando estos factores podemos evaluar el potencial osteogénico y adipocítico de CPMO en células sin diferenciar así como también el grado de diferenciación de las mismas. Para ello, en una primera etapa células provenientes de los cuatro grupos de ratas (C, M, R y RM) fueron cultivadas hasta confluencia, se obtuvieron extractos de las mismas y se analizó la expresión de Runx2 y PPAR γ (células sin diferenciar, Figura III.2.4.A). Se encontró que la expresión del factor de transcripción osteoblástico Runx2/Cbfa1 estaba significativamente disminuída en el grupo de ratas tratadas con rosiglitazona (R) respecto al control (C). La metformina (M) incrementó la expresión de este factor respecto al control cuando fue administrada como monoterapia, mientras que su coadministración con rosiglitazona previno el descenso en la expresión de Runx2 producido por esta última, llevando los valores a los niveles del control (Figura III.2.4.A).

Por otro lado, al evaluar la expresión de PPAR γ se encontró que las células provenientes del grupo R presentaban un aumento estadísticamente significativo de este factor de transcripción, respecto al grupo control (C, Figura III.2.4.B). La co-administración de metformina bloqueó el efecto de la rosiglitazona sobre la expresión de PPAR γ .

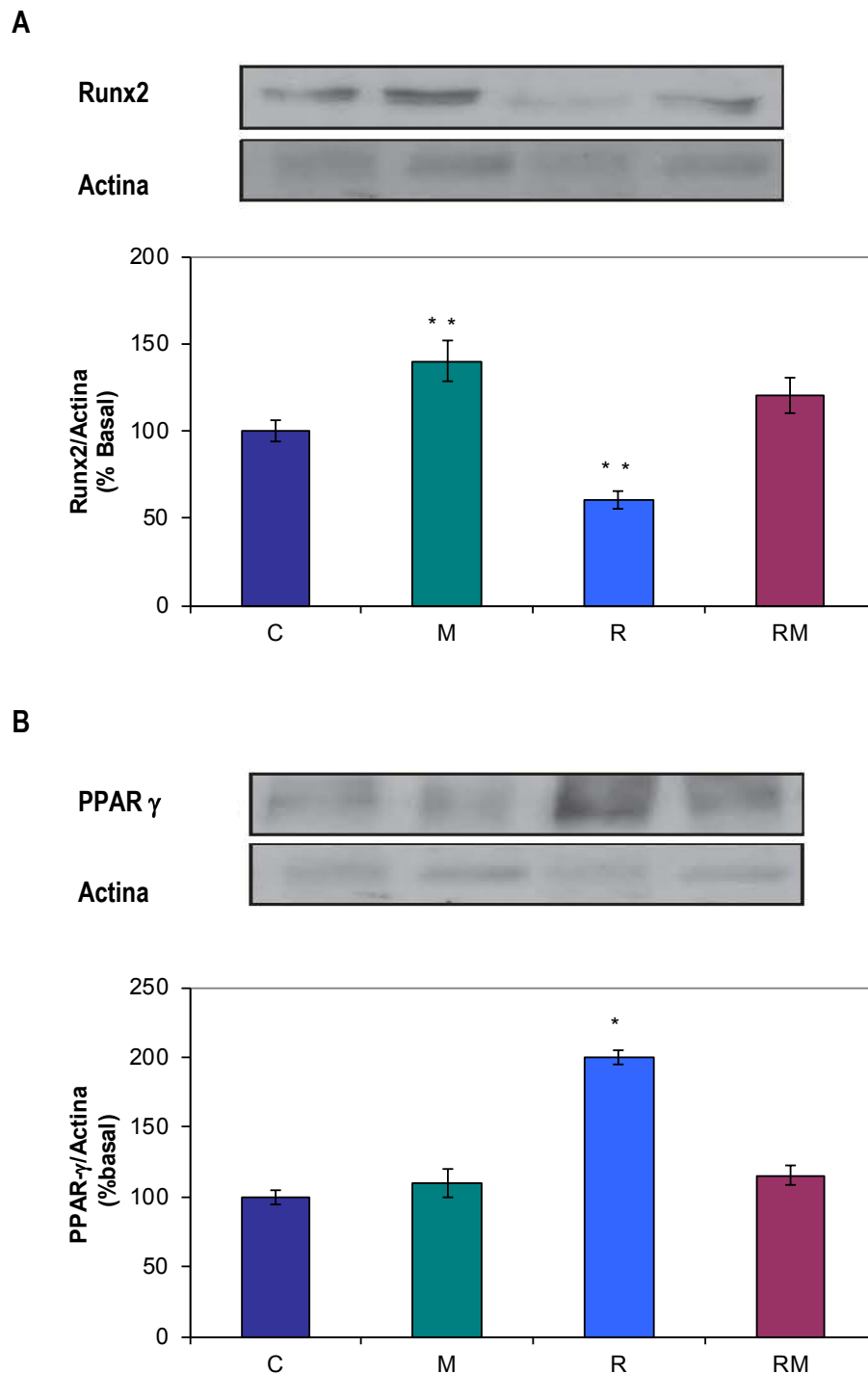


Figura III. 2.4. Efecto *ex vivo* de la metformina y la rosiglitazona en la expresión de Runx2 (A) y PPAR γ (B) en CPMO sin diferenciar. Los marcadores fueron determinados por Western blot. * $p < 0,05$ vs C; ** $p < 0,01$ vs C.

Luego de 3 semanas de diferenciación osteoblástica, las células mostraron el mismo comportamiento para la expresión de Runx2: el grupo M incrementó su expresión, mientras que

disminuyó en el grupo R; nuevamente el grupo RM expresó niveles similares a los del control (C, Figura. III.2.5.A). Por otro lado, el factor de transcripción PPAR γ no presentó diferencias significativas entre los grupos. (Figura. III.2.5.B).

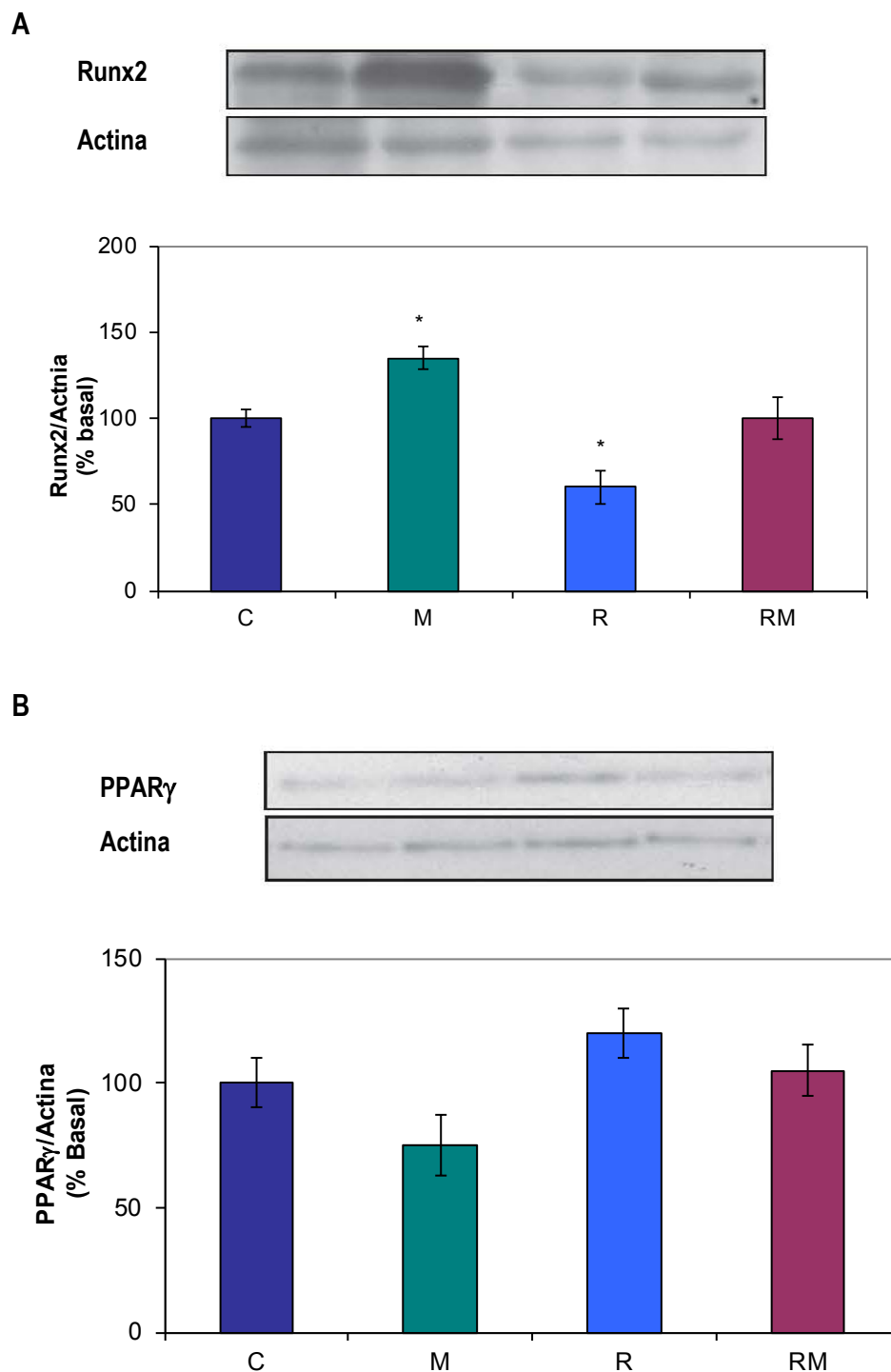


Figura III. 2. 5. Efecto *ex vivo* de la metformina y la rosiglitazona en la expresión de Runx2 (A) y PPAR γ (B) en CPMO luego de 3 semanas de diferenciación osteoblástica. Las proteínas fueron determinadas por Western blot. * $p < 0,05$ vs control.

III. 2. 2. C. Efectos de la rosiglitazona y del co-tratamiento rosiglitazona-metformina sobre la activación de la AMPK en CPMO.

Luego de tres semanas de diferenciación osteogénica, evaluamos la activación de AMPK en todos los grupos experimentales. Se encontró un incremento significativo en la activación de AMPK en el grupo metformina (M) respecto del control (C). En el grupo rosiglitazona se observó una disminución significativa de este parámetro y, nuevamente el co-tratamiento metformina-rosiglitazona previno la disminución en la activación de AMPK, inducida por el tratamiento con rosiglitazona (Figura III.2.6).

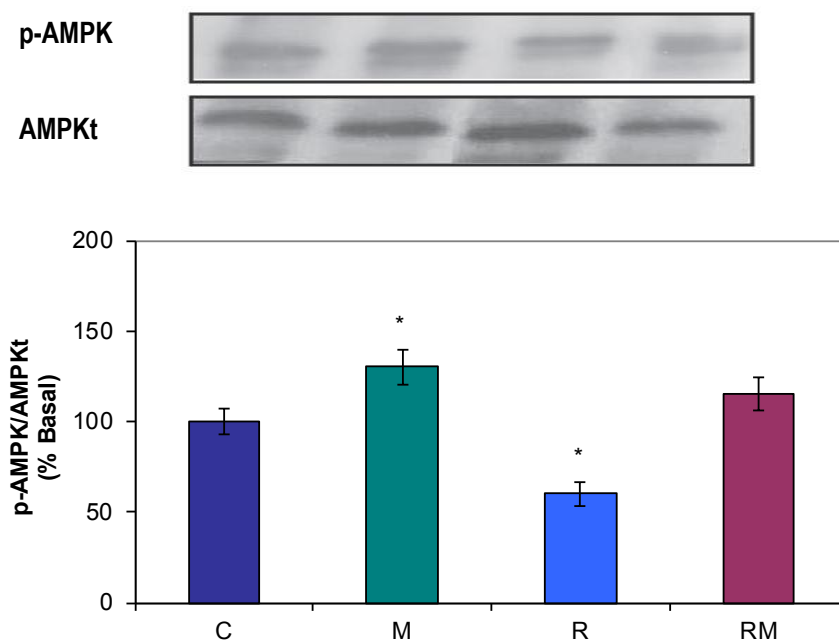


Figura III. 2. 6. Relación p-AMPK: AMPK en CPMO provenientes de los cuatro grupos experimentales. Las células fueron incubadas en medio de diferenciación osteogénico durante 3 semanas. Las proteínas fueron determinadas por Western blot. Se cuantificó la relación en la expresión de p-AMPK: AMPK. *p < a 0,05 vs C.

III. 2. 3. Estudios *in vivo*.

Efectos de la metformina, la rosiglitazona y su co-tratamiento sobre la microarquitectura femoral.

Los estudios de microarquitectura ósea se realizaron en la metáfisis proximal de fémures provenientes de los cuatro grupos experimentales. Se realizaron una serie de tinciones con el objetivo de determinar parámetros histomorfométricos. Mediante la tinción con hematoxilina y eosina se analizó el área trabecular, la densidad osteocítica y el número de osteoblastos; utilizando la histoquímica para Fosfatasa Ácida Tartrato Resistente (TRAP), se analizó el área con actividad TRAP positiva.

La Figura III. 2. 8 muestra cortes histológicos representativos teñidos con hematoxilina y eosina (A-C) o histoquímica para TRAP (D). En la imagen A se observa el extremo proximal de un fémur de rata, donde se puede distinguir una franja basófila correspondiente al cartílago de crecimiento, por encima de la cual se encuentra una zona con hueso trabecular y en la región externa cartílago articular hialino. Por debajo del cartílago de crecimiento se encuentra la metáfisis donde encontramos hueso trabecular y médula ósea. En la imagen B se pueden distinguir zonas eosinófilas y basófilas, las cuales corresponden a hueso trabecular y médula ósea respectivamente. Utilizando más aumento, en la imagen C, se aprecian células pequeñas con núcleo basófilo (osteocitos, Ot) inmersas en la matriz del hueso trabecular. En la imagen D se puede ver la presencia de áreas TRAP positivas (Fig III. 2. 8 punta de flecha) en la esponjosa primaria (zona inmediatamente subyacente al cartílago de crecimiento) las cuales se asocian con actividad osteoclástica.

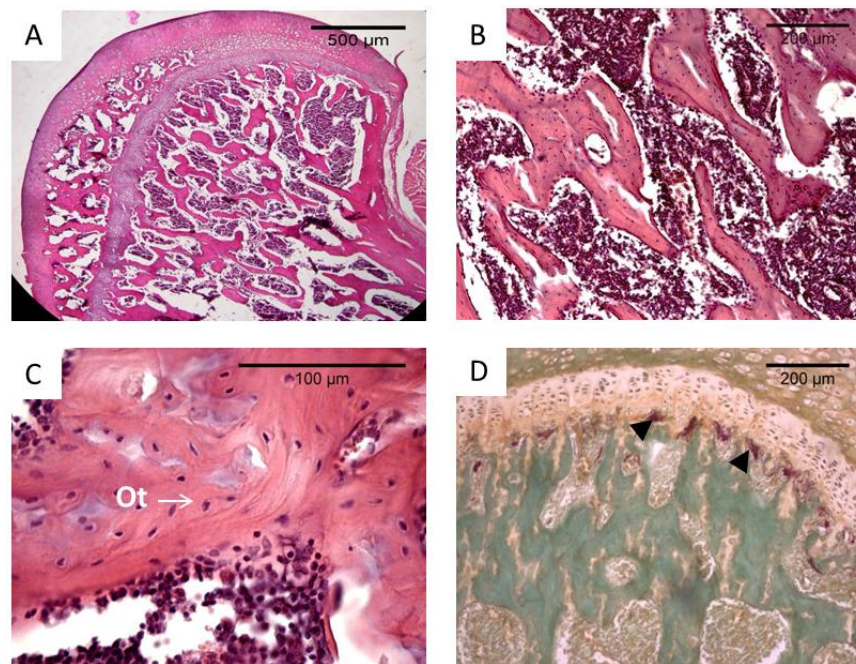
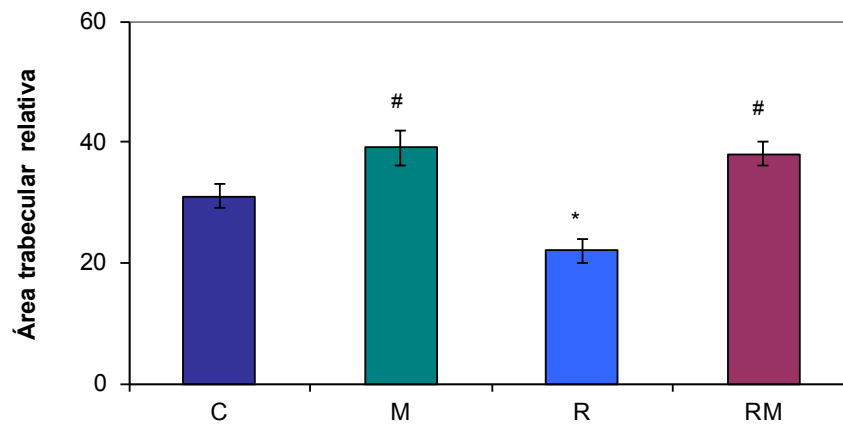


Figura III. 2. 8. Cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina (A, B y C). Histoquímica de TRAP (D). Se señalan osteocitos (Ot) y área TRAP+ (puntas de flecha negra).

La cuantificación histomorfométrica de los preparados histológicos demostró que el tratamiento oral con metformina incrementó el área trabecular relativa (26% respecto de C, figura III.2.9.A); el número de osteocitos (42% respecto de C, figura III.2.9.B); el número de osteoblastos (28% respecto de C, figura III.2.10.A) y el área con actividad TRAP (35% respecto de C, figura III.2.10.B). Por el contrario, el tratamiento con rosiglitazona disminuyó el área trabecular relativa (70% vs C, figura III.2.9.A); número de osteocitos (68% vs C, figura III.2.9.B); número de osteoblastos (65 % vs C, figura III.2.10.A) y el área con actividad TRAP (70% vs C, figura III.2.10.B). Sin embargo, cuando se analizó el tratamiento conjunto de las dos drogas se vio que la metformina previno el efecto deletéreo de la rosiglitazona en todos los parámetros permaneciendo en valores similares a los del control (Figuras III.2.9. y III.2.10).

A



B

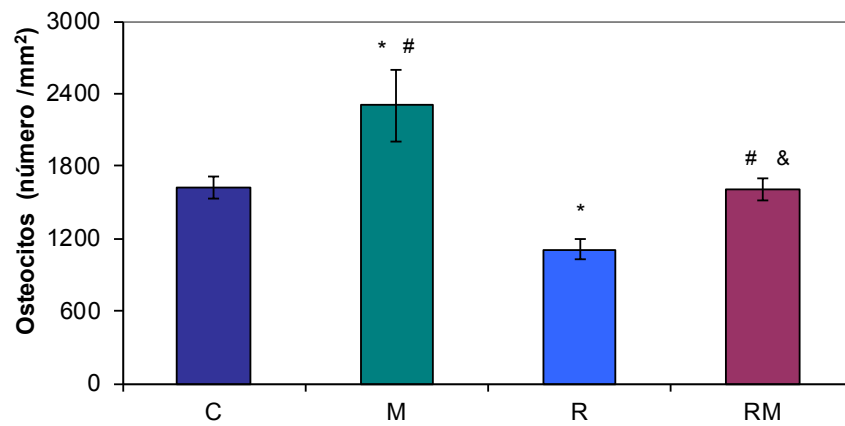
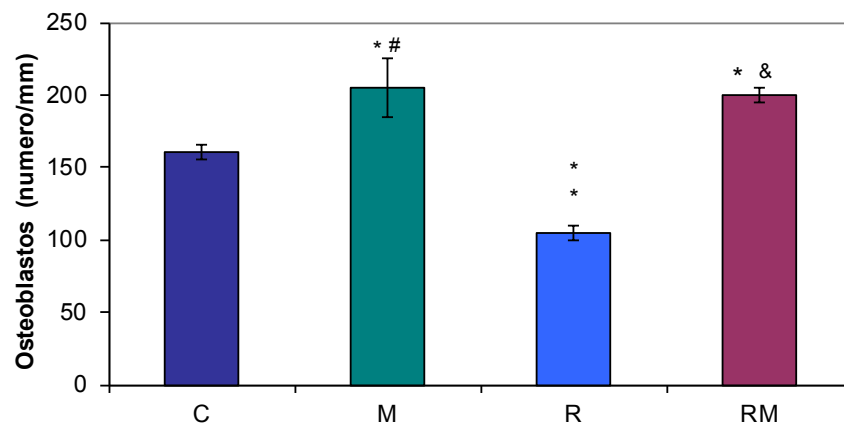


Figura III. 2. 9. Efecto del tratamiento con metformina y rosiglitazona sobre la microarquitectura ósea femoral. **(A)** Área trabecular relativa; **(B)** Número de osteocitos/mm². Los resultados se expresaron como la media ± SEM. * P < 0.05; ** P < 0.001 vs C; # p < 0.01 vs R; & p < 0.001 vs M.

A



B

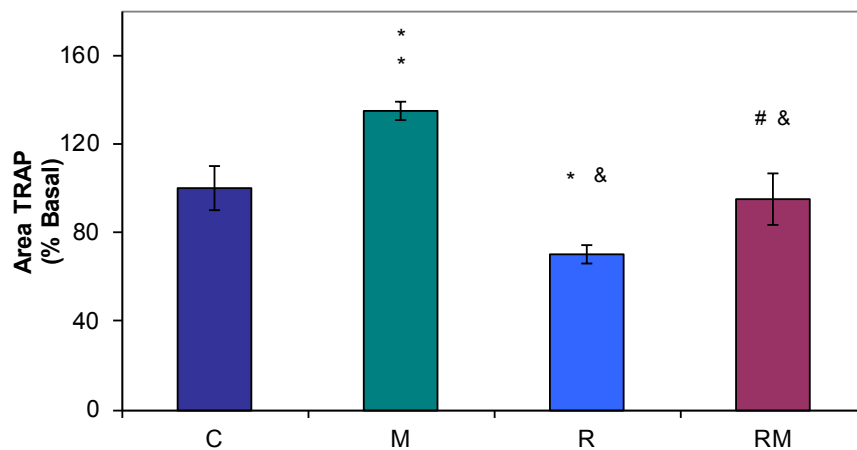


Figura III. 2. 10. Efecto del tratamiento con metformina y rosiglitazona sobre la microarquitectura ósea femoral. **(A)** Número de osteoblastos; **(B)** Histoquímica de TRAP. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$ vs C; # $p < 0.01$ vs R; & $p < 0.001$ vs M.

III. 3. Efectos del tratamiento oral con metformina en un modelo de diabetes deficiente en insulina sobre el metabolismo óseo.

Evaluación del modelo animal de estudio.

Para realizar estos estudios se utilizó un modelo animal de diabetes generado por la inyección sucesiva de ácido nicotínico y estreptozotocina como se describió en Materiales y Métodos. El esquema experimental consistió en cuatro grupos de ratas:

- Ratas control (C), a las cuales no se les realizó ningún tratamiento;
- Ratas control con Metformina (M, 100 mg/kg/día);
- Ratas diabéticas (D);
- Ratas diabéticas tratadas con metformina (DM).

En la Tabla III.3.1 se muestran los resultados de los parámetros sanguíneos posprandiales (glucemia, trigliceridemia, insulinemia y fructosamina sérica) y los niveles plasmáticos de $TNF\alpha$ de los cuatro grupos experimentales.

	Control	Metformina	Diabéticas	Diabéticas + Metformina
Glucosa [mg/dL]	165 ± 6	181 ± 9	453 ± 40 * #	309 ± 19 * ## &
Insulina [ng/dL]	1.26 ± 0.17	1.09 ± 0.30	0.45 ± 0.06 ***	0.37 ± .012 ** ##
Triglicéridos [mg/dL]	62 ± 7	54 ± 4	252 ± 25 * #	128 ± 19 *** ## &
Fructosamina [μmol/L]	147 ± 26	190 ± 13	239 ± 12 **	236 ± 16 **
TNFα [pg/mL]	24.7 ± 1.8	22.4 ± 2.7	123 ± 9.0 * #	96.9 ± 8.6 * # &&

Tabla III. 3. 1: Parámetros sanguíneos posprandiales. Se indujo un estado de diabetes deficiente de insulina mediante la inyección de ácido nicotínico y estreptozotocina como se describe en materiales y métodos. Los resultados se expresan como la media ± SEM. Diferencias respecto de C: * p<0.001; ** p< 0.01; *** p<0.05, diferencias respecto de M: # p<0.001; ## p< 0.05, diferencias respecto de D: & p<0.001; && p< 0.05.

Como puede observarse en la tabla III. 3. 1., los animales diabéticos presentaron niveles significativamente aumentados de glucemia (3 veces respecto del control), triglicéridos (4 veces respecto del control), fructosamina (1,6 veces respecto del control) y $TNF\alpha$ (5 veces respecto del control), mientras que la insulina se encontró significativamente disminuida (36% del control). Estos niveles séricos son compatibles con un estado diabético asociado a la destrucción parcial de las células β pancreáticas y la consecuente inducción de un estado inflamatorio. El tratamiento con metformina en ratas diabéticas previno parcialmente la hiperglucemia (cerca de 2 veces respecto del control) y la hipertrigliceridemia (2 veces respecto del control). A pesar de todo esto, los animales mostraron deficiente control metabólico y estrés inflamatorio evidenciado por los altos niveles de $TNF\alpha$ (4 veces respecto del control); mientras que en animales no diabéticos, el tratamiento con metformina no modificó los parámetros bioquímicos evaluados.

Estos resultados nos permiten concluir que el tratamiento con ácido nicotínico y estreptozotocina produjo un estado metabólico compatible con un cuadro de diabetes con deficiencia de insulina probablemente por destrucción parcial de las células β pancreáticas, según se ha descrito previamente [Tahara, 2008; Szkudelski, 2012].

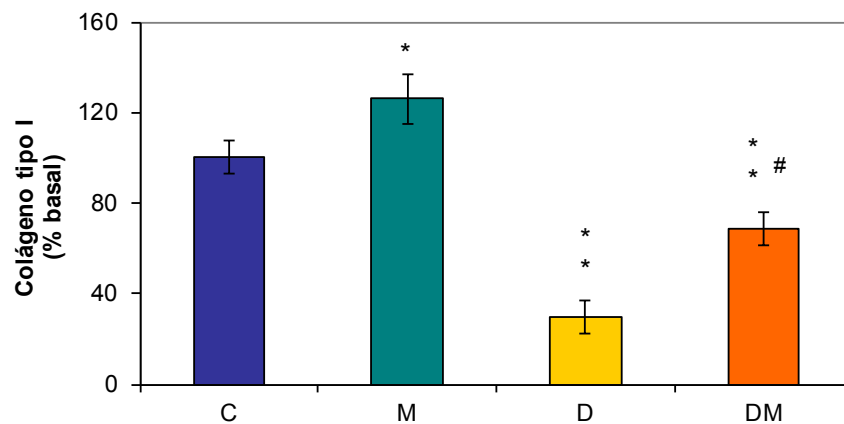
III. 3. 1. Estudios *ex vivo*.

III. 3. 1. A. Efectos sobre la diferenciación osteoblástica.

Para evaluar los posibles efectos de la condición metabólica presente en el modelo murino de diabetes, y su tratamiento con metformina sobre la diferenciación de CPMO hacia el linaje osteoblástico, se aislaron células de los cuatro grupos experimentales (C, M, D, DM). Las células aisladas fueron cultivadas hasta confluencia y se evaluaron los valores basales (sin diferenciar) de la producción de colágeno tipo I y la actividad enzimática de fosfatasa alcalina, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos (datos no mostrados). Sin embargo, luego de 15 días de diferenciación osteoblástica, se observó que el estado diabético produjo una disminución en la producción de colágeno tipo I (30% del control, Figura III.3.1.1.A), y en la actividad de fosfatasa alcalina (36% del control; Figura III.3.1.1.B). Luego de 21 días de diferenciación osteoblástica se observó un patrón similar para la producción de nódulos de mineralización, con una disminución en el grupo diabético (60% del control, Figura III.3.1. 2.) y

una reversión total del efecto de la diabetes en el grupo diabético tratado con metformina (82% mayor que el grupo diabético y 42% mayor al control Figura III.3.1.2). El efecto de la metformina fue similar al descrito en secciones anteriores (Secciones III.1.1.A y III.2.2.A). Es decir, esta droga incrementó la producción de colágeno tipo I, la actividad de fosfatasa alcalina y mineralización de la matriz extracelular (Figura III.3.1.1 y Figura III.3.1.2).

A



B

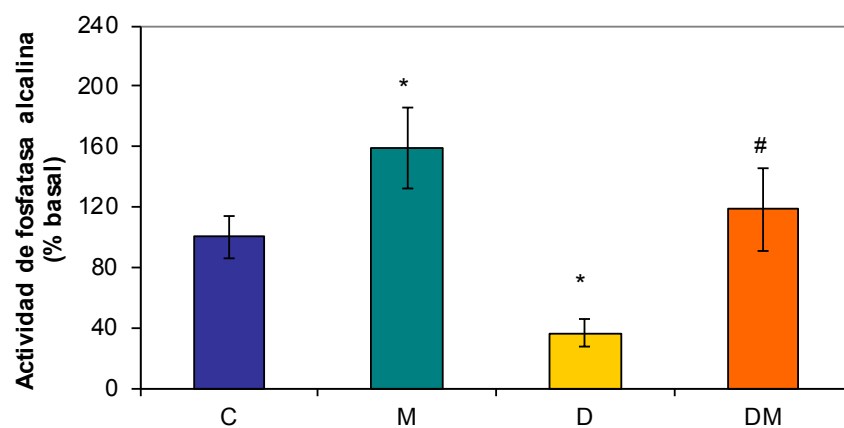


Figura III.3.1.1. Efecto de la administración oral de metformina en ratas diabéticas y no diabéticas sobre el potencial osteogénico de las CPMO. Se analizó la producción de colágeno tipo I (A) y la actividad de fosfatasa alcalina (B). Los valores fueron expresados como la media \pm SEM. Diferencias respecto al control: * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; diferencias respecto a D: # $p < 0.001$.

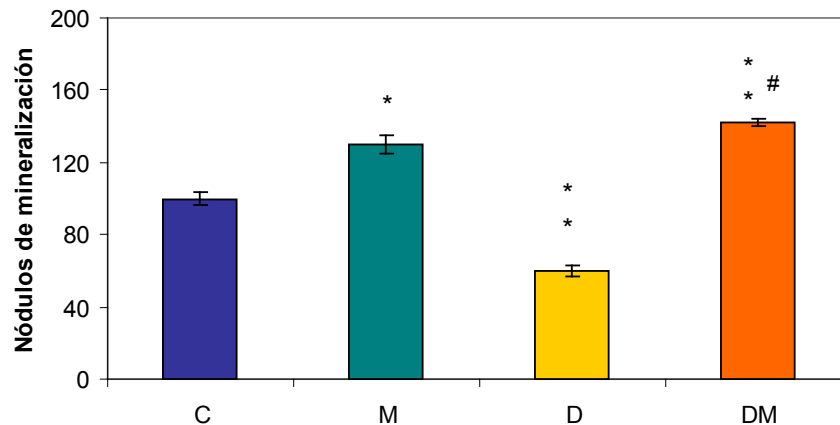
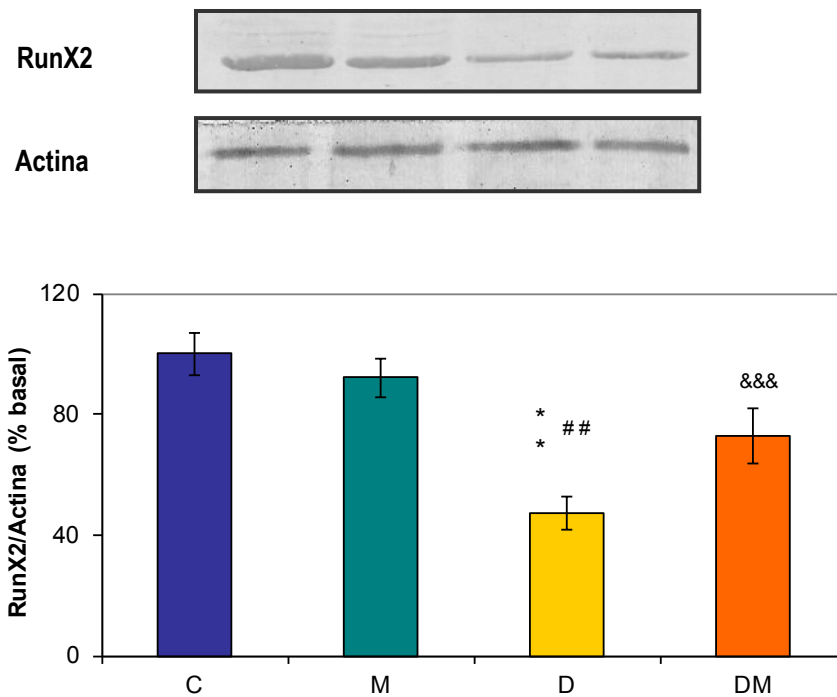


Figura III.3.1.2. Producción de nódulos de mineral en CPMO. Luego de 21 días de diferenciación a osteoblastos se midió la capacidad de mineralizar la matriz extracelular. Los valores fueron expresados como la media \pm SEM. Diferencias respecto al C: * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; diferencias respecto a D: # $p < 0.001$.

III. 3. 1. B. Expresión de factores de diferenciación osteoblásticos y adipogénicos.

Con el fin de evaluar los mecanismos involucrados en los procesos descritos en la sección anterior, se analizaron los cambios en la expresión de los dos principales factores de transcripción osteogénicos y adipogénicos, Runx2 y PPAR γ . Para ello, las CPMO provenientes de cada grupo experimental fueron cultivadas en medio de diferenciación osteoblástico durante 15 días y luego se evaluaron los niveles de dichos factores de transcripción en extractos celulares por Western blot. El análisis densitométrico de los geles demostró que las CPMO provenientes de ratas diabéticas expresaron menor cantidad del factor de transcripción Runx2 que las células provenientes del grupo control (Figura III.3.1.3.A), mientras que las CPMO obtenidas de ratas no diabéticas tratadas con metformina no presentaron diferencia significativa respecto al control. Sin embargo, en el grupo diabético tratado con metformina se observó una prevención parcial del efecto de la diabetes sobre la expresión del factor de transcripción Runx2 (Figura III.3.1.3.A).

A



B

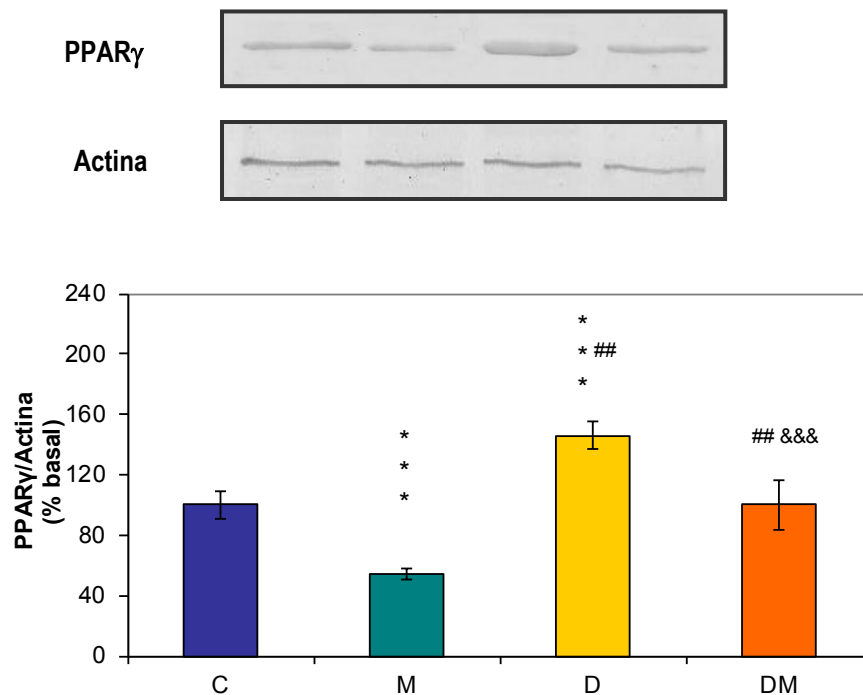


Figura III. 3.1.3. Expresión de factores de transcripción osteoblásticos y adipogénicos en CPMO. Luego de 15 días de diferenciación adipogénica se evaluó: **(A)** Factor de transcripción osteogénico Runx2. **(B)** Factor de transcripción adipocítico PPAR γ . Los valores fueron expresados como la media \pm SEM. Diferencias respecto a C: * p <0.05, ** p <0.01, *** p < 0.001; diferencias respecto a M: # # p <0.001; diferencias respecto a D: && p <0.01, &&& p < 0.001.

Por otro lado, la diabetes incrementó significativamente la expresión del factor de transcripción adipogénico PPAR γ respecto al control, luego de 15 días de diferenciación osteoblástica (Figura III.3.1.3.B). El tratamiento *in vivo* con metformina (tanto en ratas no diabéticas como en diabéticas) indujo la reducción de la expresión de PPAR γ .

Si se analiza el cociente entre Runx2/PPAR γ (tabla III. 3. 2) se puede observar que las ratas diabéticas presentan un desbalance en la relación Runx2/PPAR γ lo cual sugiere una disminución en el potencial osteogénico, efecto que se ve revertido parcialmente en las ratas diabéticas tratadas con metformina.

	Control	Metformina	Diabéticas	Diabéticas+ metformina
Runx2/PPAR γ	1	1,7	0,3	0,7

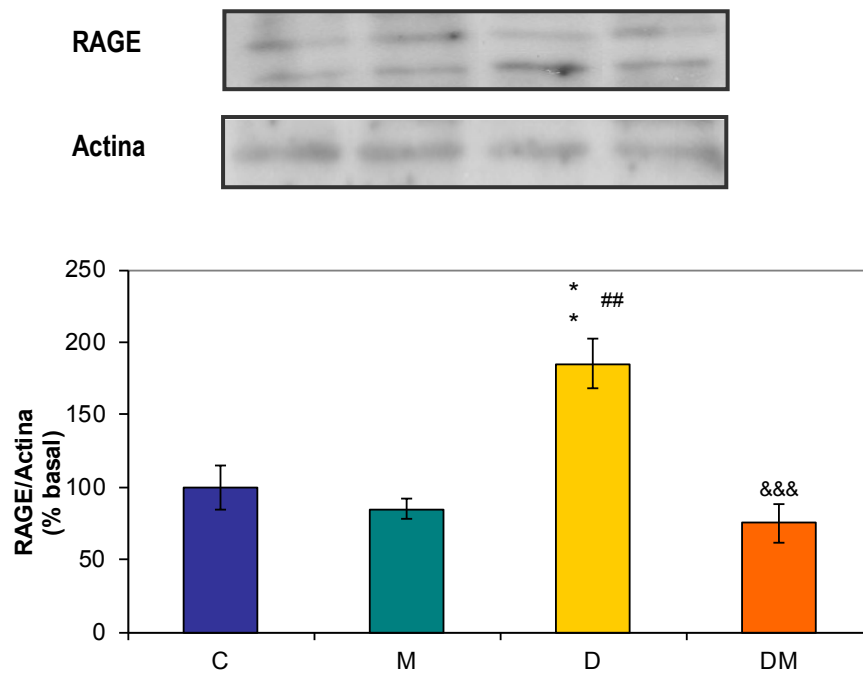
Tabla III. 3. 2. Relación entre Runx2 y PPAR γ .

III. 3. 1. C. Efectos sobre la expresión del RAGE en CPMO

La hiperglucemia crónica está asociada con un aumento en la concentración de AGEs, lo cual, a su vez llevará a un incremento en la expresión de su receptor RAGE [Kulkarni, 2013]. Considerando que las células de médula ósea de ratas diabéticas podrían haber estado expuestas a altas concentraciones locales de AGEs, se evaluó la expresión del RAGE en las CPMO y si ésta era influenciada por las diferentes condiciones experimentales.

Las CPMO provenientes de ratas diabéticas (D) presentaron un aumento significativo en la expresión de RAGE respecto al control (C), tanto en células sin diferenciar (Figura III.3.1.4.A) como en células sometidas a 15 días de diferenciación a osteoblastos (Figura III.3.1.4.B). Por otro lado, en el grupo DM la metformina previno completamente el efecto de la diabetes sobre el aumento en la expresión del RAGE; mientras que no modificó la expresión del RAGE en CPMO de ratas no diabéticas (M).

A



B

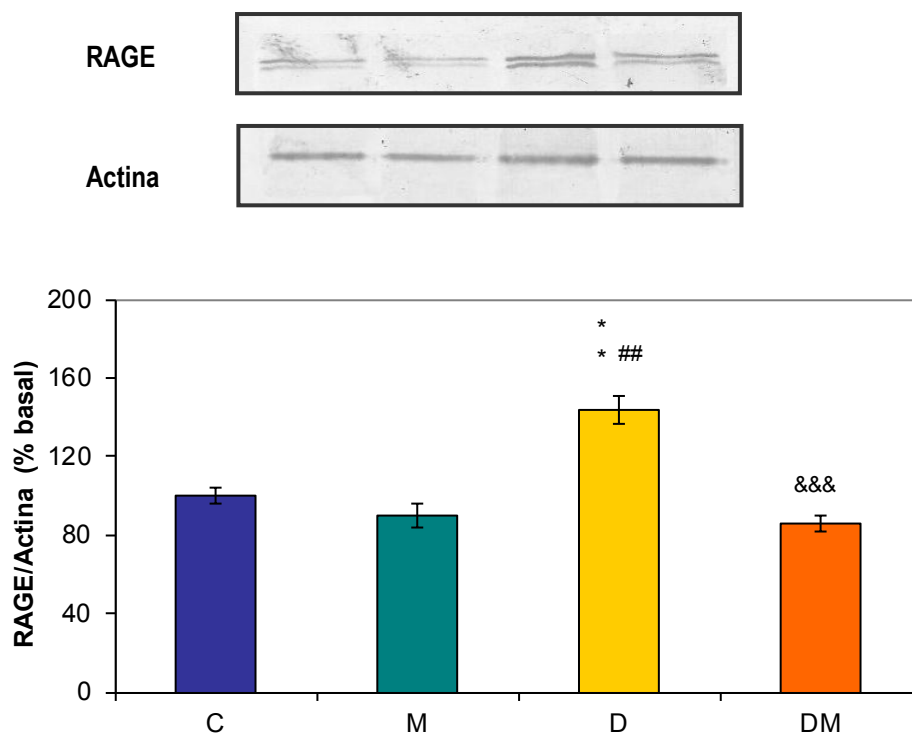


Figura III.3.1.4. Expresión de RAGE en CPMO. Células sin diferenciadas (**A**); células diferenciadas 15 días (**B**). Los datos fueron analizados teniendo en cuenta la relación RAGE/actina. Los valores se expresaron como la media \pm SEM. Diferencias respecto a C: **p < 0.01; diferencias respecto a M ## p < 0.001; diferencias respecto a D &&& p < 0.001.

III. 3. 2. Estudios *in vivo*.

Efectos sobre la microarquitectura ósea femoral.

Para evaluar la microarquitectura de huesos largos, se procedió a realizar una serie de cortes histológicos de los fémures obtenidos de los cuatro grupos experimentales: ratas controles (con y sin tratamiento con metformina) y ratas diabéticas (con y sin tratamiento con metformina). El análisis histomorfométrico de los grupos experimentales reveló cambios en la microarquitectura ósea asociados con la diabetes y el tratamiento con metformina.

	Control	Metformina	Diabética	Diabética+Metformina
Área trabecular [%]	39 ± 2	45 ± 3	33 ± 2 # *	41 ± 3
Nº Osteocitos [Nº/mm ²]	1515 ± 148	2477 ± 223 ***	898 ± 103 *, ##	1470 ± 108 **, ##, &
Área TRAP [%]	6.1 ± 0.7	13.2 ± 2.1 ***	2.2 ± 0.5 ***, ##	8.2 ± 0.9 *, #, &&
Altura de la placa de crecimiento[µm]	210 ± 3	226 ± 8	103 ± 5 ***, ##	128 ± 4 ***, ##, &&

Tabla III.3.3. Análisis histomorfométrico de fémures de los cuatro grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media ± SEM. Diferencias respecto de C: * p<0.05; ** p< 0.01; *** p<0.001; Diferencias respecto de M: # p<0.05; ## p< 0.001; Diferencias respecto de D: & p<0.05; && p< 0.01; &&& p< 0.001.

Al comparar los resultados obtenidos para las ratas diabéticas y controles, se vio que las primeras mostraron una leve disminución en el área trabecular (85% de C, Tabla III.3.3.), una disminución significativa en la densidad osteocítica (60% de C, Figura III.3.2.1.C), en la actividad TRAP (36% de C, Figura III.3.2.1.G) y en la altura de la placa de crecimiento (47% de C, Figura III.3.2.1.K). También se observó un incremento en la densidad adipocítica de la médula ósea (adipocitos señalados en la figura con flechas). Por otro lado, en animales diabéticos, la administración oral de metformina previno parcialmente los efectos de la diabetes en cuanto a la disminución de la densidad osteocítica (163% de D, Figura III.3.2.1.D), del área TRAP (370% de D, Figura III.3.2.1.H), y la altura de la placa de crecimiento (124% de D, Figura III.3.2.1.L), y previno completamente el incremento de la adiposidad de la médula ósea. El tratamiento con

metformina en animales no diabéticos indujo un aumento significativo de la densidad osteocítica (163% de C, Figura III.3.2.1.B) y en el área TRAP (216% de C, Figura III.3.2.1.F).

La Figura III.3.2.1 muestra fotos representativas de preparados histológicos de fémur provenientes de los distintos grupos experimentales.

Las imágenes A-D corresponden a cortes teñidos con Hematoxilina – Eosina, en donde se observan las diferencias en la densidad osteocítica entre los cuatro grupos experimentales: control (C), metformina (M), diabética (D) y diabética tratada con metformina (DM).

En las fotos E-H, se observan cortes a los que se les realizó histoquímica para TRAP. Se distinguen áreas con actividad de esta enzima en violeta (señalados con flechas).

La tinción de azul alcian se muestra en los cortes I-L, en donde se puede distinguir en azul claro el cartílago de crecimiento.

En todas las fotos del grupo D (C, G y K) se ven espacios en blanco dentro de la médula ósea, correspondientes a adipocitos (marcados con puntas de flechas).

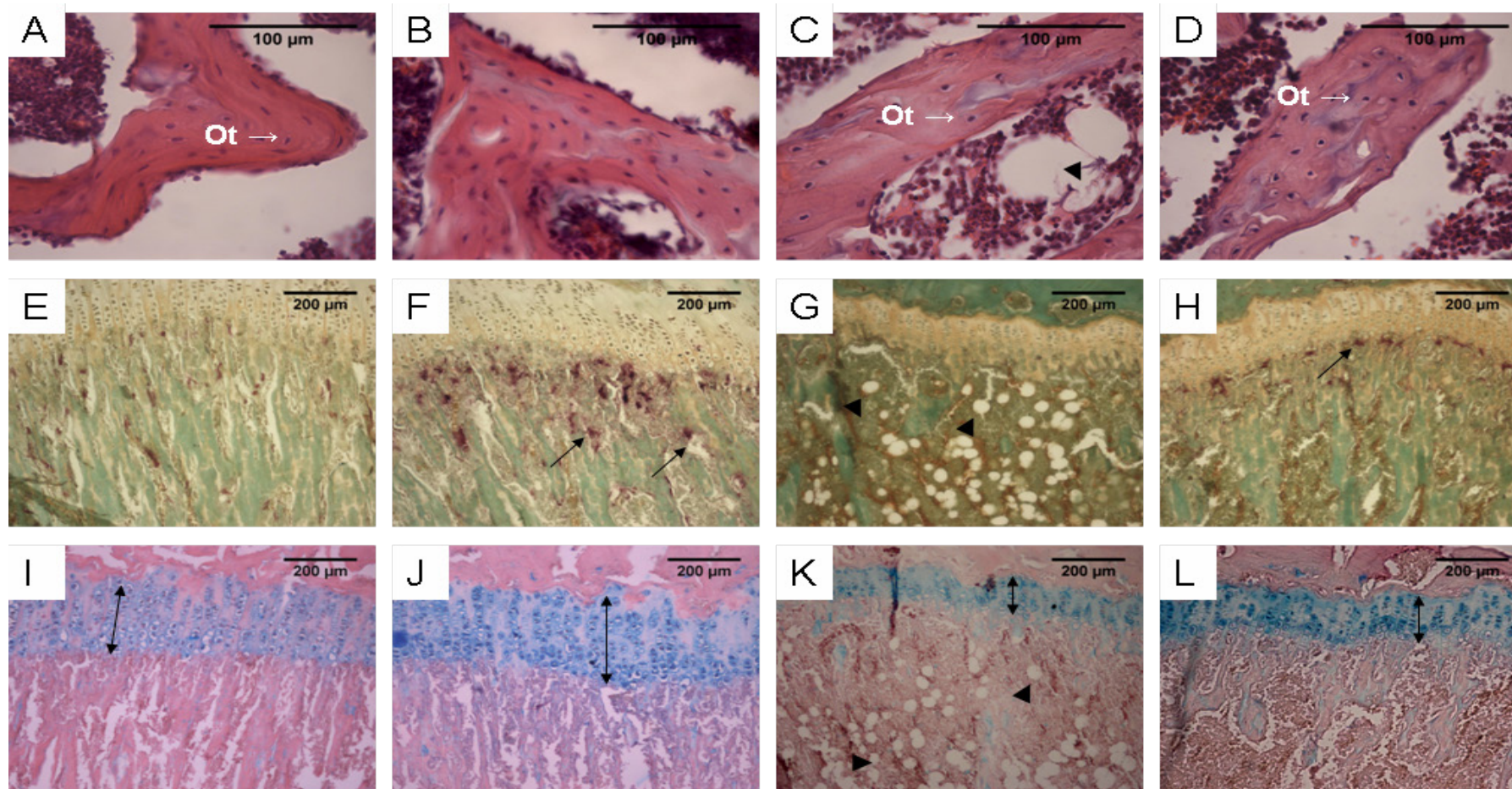


Figura III. 3.2.1. Efectos de la metformina y la diabetes sobre la microarquitectura ósea femoral de ratas. Fotos de cortes histológicos representativos de fémures de ratas control (A,E,I); no diabéticas tratadas con metformina (B,F,J); diabéticas sin tratamiento (C,G, K), y diabéticas tratadas con metformina (D,H,L). Los cortes histológicos fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina (A-D), histoquímica para TRAP (E-H); y Azul Alcian (I-L). Las flechas blancas señalan osteocitos (Ot), las flechas negras señalan área TRAP, las puntas de flecha negra señalan adipocitos, y las doble flechas negras la altura de la placa de crecimiento.

DISCUSIÓN



La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglucemia. Las complicaciones de esta patología son diversas, generando disfunción en varios órganos principalmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos. Los pacientes que padecen diabetes también tienen mayor incidencia de fracturas, no solo porque son más propensos a caídas, sino porque además presentan alteraciones esqueléticas, que influyen sobre la calidad ósea [Montagnani, 2013].

El hueso es un órgano que contiene diferentes tipos celulares implicados en el mantenimiento y reparación del mismo. Algunas de las células involucradas en estos procesos derivan de las células progenitoras de médula ósea (CPMO), las cuales dependiendo del microentorno, expresarán factores de transcripción específicos que les permitirán diferenciarse a osteoblastos (aumentando la expresión de *Runx2/cbfa1*), adipocitos (activando al factor de transcripción *PPAR γ*) o condrocitos (expresando *sox-9*).

La metformina es una droga ampliamente utilizada en el tratamiento de la diabetes, y por esto resultó interesante evaluar el efecto de la misma sobre la diferenciación osteoblástica de CPMO como primer objetivo de esta tesis.

En la sección III. 1. 1 se describió que la metformina ejerce un efecto directo sobre la diferenciación osteoblástica de CPMO *in vitro*. La matriz extracelular del tejido óseo posee un alto contenido de colágeno tipo I (col tipo I), y la expresión elevada de la enzima fosfatasa alcalina (FAL) actúa como mediador de la formación de sales insolubles de fosfato iniciando, en consecuencia, el proceso de mineralización [Kume, 2005]. Los resultados obtenidos evidenciaron un aumento de la producción de colágeno tipo I y expresión de FAL luego de 15 días de diferenciación osteoblástica; y producción de nódulos de mineralización en la matriz extracelular (min, luego de 21 días de cultivo en medio de diferenciación). Esto condice con lo descrito por varios autores, quienes reconocen como marcadores de diferenciación temprana de osteoblastos la expresión de fosfatasa alcalina, colágeno tipo I, osteopontina, sialoproteína ósea; y como marcadores de diferenciación tardía osterix y la mineralización de la matriz extracelular en CPMO humanas y en células de calvaria fetal de rata [Jaiswal 1997; Malaval, 1999; Stein, 1990; Born A-K, 2009].

Además, la inducción de la diferenciación osteoblástica producida por la metformina mostró una dependencia de la dosis empleada. Este mismo efecto fue visto en células MC3T3-E1 en trabajos previos de nuestro grupo [Cortizo, 2006]. Kanazawa también describió, utilizando este mismo tipo celular, que la metformina incrementa significativamente la producción de colágeno tipo I, estimula la actividad de la enzima fosfatasa alcalina y potencia la formación de nódulos de mineral en forma dosis dependiente [Kanazawa, 2008].

Basado en estos resultados se decidió evaluar el efecto *ex vivo* de la metformina sobre la capacidad osteogénica de CPMO de ratas. Se observó que la metformina incrementa el potencial osteogénico de CPMO de ratas que recibieron un tratamiento oral con la droga durante 15 días. Estas células mostraron un aumento en la expresión de colágeno tipo I, actividad específica de FAL, producción de nódulos de mineralización y expresión de osteocalcina (sección III. 1. 2, Figuras III. 1. 4 y III. 1. 5), efectos posiblemente mediados por el incremento observado en la expresión del factor de transcripción esencial para la diferenciación osteoblástica Runx2 (Figura III. 1. 6.). El proceso de inducción de la expresión de marcadores específicos de osteoblastos mediada por Runx2 también fue descrita por Cohen [Cohen, 2006].

También se realizaron estudios para tratar de elucidar el mecanismo de acción de la metformina en la diferenciación osteogénica de CPMO. Utilizando técnicas de inmunofluorescencia y western blot se observó que la metformina potenciaba la fosforilación de AMPK (Figura III. 1. 8). Estos mismos resultados fueron observados en osteoblastos MC3T3-E1 por otros autores [Kanasawa, 2008; Jang G, 2011a] que además estudiaron otros aspectos del posible mecanismo involucrado. El grupo de Kanasawa observó que la fosforilación de la AMPK, mediada por metformina, aumentaba la expresión de eNOS y BMP-2, mientras que el grupo de Jang encontró que la AMPK es capaz de aumentar el factor de transcripción Runx2 a través de la expresión de Smad1/5/8-Dlx5 en esta línea celular. La fosforilación de Smad1/5/8 es un evento celular crítico para la diferenciación de los osteoblastos inducida por BMP-2. Cuando BMP-2 se une al receptor de BMP tipo I (BMPR-1) y tipo II (BMPR-II), Smad1/5/8 se fosforila e induce la expresión de genes específicos de osteoblastos, como Dlx5, que a su vez regula la expresión de Runx2. Jang y colaboradores también encontraron ese mismo año, que la metformina puede estimular la diferenciación de osteoblastos MC3T3-E1 a través de la activación de Runx2 vía AMPK/usf-1/shp [Jang G, 2011b].

El óxido nítrico (NO) es una molécula de señalización producida en las células óseas. La fuente de producción de NO, en osteoblastos es la eNOS, la cual se expresa constitutivamente. La isoforma eNOS parece jugar un papel clave en la regulación de la actividad de osteoblastos y en la formación de hueso, ya que los ratones knockout para eNOS tienen osteoporosis debido a un defecto en la formación de hueso [Zhong, 2011]. Nuestro grupo de trabajo ha demostrado en células MC3T3-E1 que el aumento en la expresión de eNOS por metformina estimula la diferenciación osteoblástica [Cortizo, 2006].

Para confirmar que la activación de la AMPK participa en la diferenciación osteoblástica y que la metformina induce este proceso, se realizaron ensayos *in vitro* con CPMO de ratas controles, que fueron diferenciadas a osteoblastos en presencia de metformina sola o de

metformina con un inhibidor directo de la AMPK, el compuesto C. Los resultados mostraron que el compuesto C era capaz de inhibir la fosforilación de la AMPK y en consecuencia disminuir la síntesis de colágeno tipo I luego de 15 días de cultivo (sección III. 1. 2. C, Figura III. 1.10). En concordancia con estos resultados, Kim reportó que, en células mesenquimáticas humanas, la presencia de compuesto C en el medio de cultivo disminuía la diferenciación osteoblástica, proceso evidenciado por la disminución en la expresión de mRNA de FAL, RUNX2 y OCN (tres genes claves relacionados con la osteogénesis) [Kim E, 2012]. También observó que el compuesto C reducía la mineralización de la matriz extracelular. En conclusión, nuestros resultados y los reportados por este grupo, indicarían que la mineralización de la matriz extracelular y la expresión de genes específicos de osteoblastos estarían asociadas con la activación de AMPK.

Nuestro grupo previamente ha demostrado que la metformina incrementa la fosforilación de ERK en pre-osteoblastos MC3T3-E1 [Cortizo, 2006] y en la sección III. 1. 2. C se vio que esta droga aumentaba la fosforilación de AMPK en CPMO de ratas. Resultados similares fueron reportados por Kim [Kim E, 2012] quien no solo demostró estos mismos efectos en CPMO humanas (aisladas de tejido adiposo) sino que también descubrió que la fosforilación de la AMPK estaba directamente relacionada con la fosforilación de las ERK durante el proceso de diferenciación osteoblástico.

Un buen control glucémico es importante para prevenir las complicaciones de la diabetes mellitus; en el caso de la DM tipo 2, el control de la glucemia puede ser mejorado con un cambio en el estilo de vida (comida sana y ejercicio) y/o con el uso de algún agente farmacológico oral ya sea en monoterapia o terapia combinada. La rosiglitazona es una droga que disminuye eficientemente la resistencia a la insulina, lo cual induce una mayor sensibilidad de los tejidos a esta hormona, y por ende es muy efectiva en el control glucémico. Se ha descrito que esta droga fomenta el aumento de peso, la retención de líquido, incrementa el riesgo cardiovascular así como también el riesgo de fracturas. Debido a estos hallazgos, en el año 2010 la FDA (Food and Drug Administration) restringió la droga y anunció que la rosiglitazona solo podría ser administrada a pacientes que no tuvieran otro tipo de opciones para regular la glucosa plasmática y que, previo a su administración, éstos deberían estar informados de los riesgos que ocasiona la droga [Kung, 2012].

Si bien la monoterapia con rosiglitazona se asocia con alteraciones óseas [Grey, 2008], la monoterapia con metformina se asocia con una disminución en el riesgo de fracturas [Vestergaard P, 2005]. Existe como opción terapéutica para el tratamiento de la diabetes tipo 2, combinar rosiglitazona con metformina. Sin embargo, no existían estudios del efecto de este co-

tratamiento sobre alteraciones óseas o sobre las CPMO, lo cual motivó al estudio de los efectos de dicho tratamiento sobre el metabolismo óseo.

Como una primera aproximación, y teniendo en cuenta que la rosiglitazona produce compromiso de las CPMO hacia el fenotipo adipocítico (debido a que es un ligando sintético de PPAR γ al cual se une y estimula la diferenciación a adipocitos bloqueando la diferenciación a osteoblastos) [Lehmann, 1995; Lecka-Czernik, 2002], se realizaron ensayos *in vitro* donde se co-incubaron las CPMO con ambas drogas con el objetivo de ver si este tratamiento prevenía la inducción adipocítica mencionada. En la sección III. 2. 1. se demostró que en presencia de metformina y rosiglitazona, la diferenciación de las CPMO al fenotipo adipocítico, medido como concentración de lípidos intracelulares, disminuía en forma dosis dependiente con el aumento en la concentración de metformina (Figura. III.2.1). A su vez, pacientes tratados con rosiglitazona durante períodos prolongados podrían sufrir pérdida de masa ósea [Backesjo, 2009]. En contraste con la acción de las tiazolidinedionas, la metformina inhibe el proceso de diferenciación adipogénica de las CPMO en cultivo (Figura III. 2. 1.). Por esto, la metformina podría ser beneficiosa para el metabolismo óseo en el tratamiento combinado con rosiglitazona.

Basado en estos resultados, se realizaron experimentos con ratas a las que se les administró metformina y/o rosiglitazona para evaluar el efecto de estas drogas sobre el potencial osteogénico de CPMO y la microarquitectura femoral. En estos ensayos se encontró que la administración de rosiglitazona como monoterapia durante 2 semanas disminuyó significativamente los siguientes parámetros respecto al control: área trabecular de la metafisis femoral, densidad osteocítica, actividad TRAP asociada a osteoclastos en la esponjosa primaria y el potencial osteogénico de CPMO (sección III. 2. 2 y sección III. 2. 3). Por el contrario, luego de 2 semanas de administración oral de metformina todos los parámetros mencionados se elevaron significativamente (comparados con el control). Sin embargo, el tratamiento con las dos drogas en conjunto previno parcial o totalmente el efecto nocivo de la tiazolidinediona tanto en la microarquitectura femoral como en el potencial osteogénico de CPMO.

A partir de esta evidencia se trató de dilucidar los mecanismos por los cuales la metformina y/o la rosiglitazona tienen su efecto sobre el hueso. Para esto, se determinaron los niveles de Runx2 y PPAR γ en CPMO de ratas control (C), tratadas con metformina (M), rosiglitazona (R) y con las dos drogas en conjunto (RM). Tanto en células sin diferenciar como en células luego de tres semanas de diferenciación osteoblástica, se vio un incremento en la expresión de Runx2 sin tener efecto sobre la expresión de PPAR γ (Figura III. 2. 4 y III. 2. 5). Por otro lado, la monoterapia con rosiglitazona estimuló la expresión de PPAR γ y disminuyó la

expresión de Runx2, sugiriendo que las tiazolidinedionas estimulan la adipogénesis y reducen el compromiso osteoblástico de CPMO. Esto condice con la función del PPAR γ como factor de transcripción esencial en la diferenciación de CPMO hacia el linaje adipocítico en detrimento del osteoblástico [Akune, 2004] y demuestra el papel fundamental de esta proteína en el metabolismo adipocítico y en el balance osteoblástico/adipocítico [Kawaguchi, 2005] así como su inducción por medio de la rosiglitazona [Lehmann, 1995].

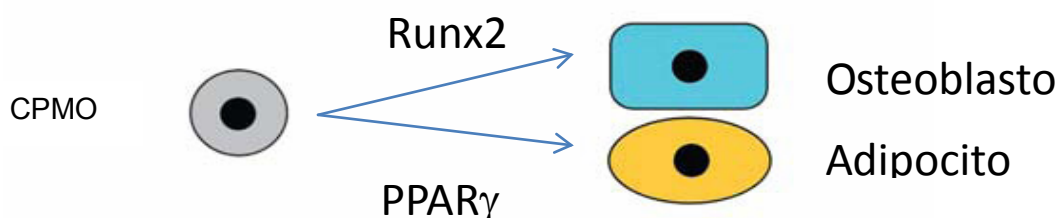


Figura IV.1. Factores de transcripción implicados en la diferenciación de CPMO [Kawaguchi, 2005].

Las CPMO obtenidas de las ratas que recibieron el co-tratamiento mostraron una reversión de los niveles de Runx2 y PPAR γ hasta valores similares a los de las ratas sin tratamiento. Por otro lado, cuando se analizó la expresión de p-AMPK y AMPK en los grupos C, M, R y RM (sección III. 2. 2. C), se observó que la relación p-AMPK/AMPK en CPMO obtenidas de ratas tratadas con metformina se veía incrementada, disminuida en las tratadas con rosiglitazona y revertida a valores similares a los del control en las tratadas con ambas drogas. Otros autores han demostrado que PPAR γ se modifica en función de la actividad de la AMPK. La fosforilación de p300 (un coactivador de PPAR γ) por la AMPK reprime las funciones de transactivación de PPAR γ en forma tanto dependiente como independiente del ligando [Yang, 2001], induciendo una disminución de la capacidad de las tiazolidinedionas de incrementar la diferenciación adipogénica en CPMO. El tratamiento con rosiglitazona indujo un incremento en la activación de PPAR γ , lo cual podría ser interpretado como potenciador adipogénico de las CPMO que fue contrarrestado por el efecto de la metformina como represor de su actividad.

Los resultados expuestos en esta tesis son los únicos que evalúan las consecuencias patofisiológicas básicas (y el posible mecanismo de acción) del efecto de la terapia combinada metformina-rosiglitazona sobre el metabolismo óseo. Por otro lado, los efectos de esta estrategia terapéutica sobre el hueso han sido analizados en varios estudios clínicos. El estudio ADOPT [Kahn, 2008] mostró una asociación entre el tratamiento a largo plazo con rosiglitazona y el aumento en el riesgo de fracturas de extremidades en mujeres con diabetes tipo 2 (pero no en

hombres) cuando se las comparaba con pacientes que tomaban metformina como monoterapia. La terapia combinada metformina con rosiglitazona (versus la monoterapia con metformina) se asocia con un 50% de incremento en fracturas de cadera; sin embargo, las fracturas no fueron discriminadas por el género de los pacientes [Tzoulaki, 2009]. Estos estudios clínicos parecerían indicar que la incidencia de fracturas sería elevada en pacientes que recibieron monoterapia con rosiglitazona por períodos prolongados; baja en pacientes que recibieron solo metformina; e intermedia cuando la rosiglitazona se administra combinada con metformina o sulfonilureas.

La osteoporosis es una enfermedad muy frecuente y su incidencia va en aumento en relación con la mayor expectativa de vida de los seres humanos. Actualmente se la define como una enfermedad esquelética sistémica que se caracteriza por baja masa ósea y deterioro de la microarquitectura, con incremento de la fragilidad y susceptibilidad para las fracturas [Chan GK, 2002]. Clínicamente se la reconoce por fracturas de cadera, vértebras, muñecas, etc. como consecuencia traumas mínimos, las cuales se asocian con un incremento significativo en la morbilidad, mortalidad y reducción en la calidad de vida.

La diabetes se asocia con osteoporosis debido a que los pacientes diabéticos poseen el recambio óseo y la integridad esquelética disminuidos [Starup-Linde, 2013]. La diabetes afecta cada vez a más personas, debido a cambios en estilo de vida, sin embargo las alteraciones óseas son diferentes: los pacientes con diabetes tipo 1 tienden a tener baja densidad mineral ósea e índice de fracturas aumentado, mientras que los pacientes con diabetes tipo 2 presentan densidad mineral ósea normal o aumentada pero índice de fracturas incrementado. La diabetes afecta al hueso de múltiples maneras, algunos de los factores que se incluyen son: obesidad, cambios en los niveles de insulina y concentraciones altas de productos de glicación avanzada sobre proteínas de matriz extracelular y proteínas intracelulares [Isidro, 2010].

Los modelos animales de diabetes son muy variados y han sido utilizados para dilucidar el mecanismo por el cual la diabetes altera la calidad ósea. La estreptozotocina induce en roedores una deficiencia insulínica total y ha sido usado como modelo de diabetes tipo 1.

En este trabajo de tesis se utilizó un modelo de diabetes inducida por la inyección de streptozotocina (STZ) y nicotinamida (NA), el cual se caracteriza por presentar moderada hiperglucemia, dislipemia y tolerancia a la glucosa alterada debida a la pérdida de secreción de insulina de fase temprana, pero sin la presencia de insulino-resistencia ni obesidad [Szkudelski, 2012]. Empleando este modelo, y basados en los conocimientos previos sobre la acción de la metformina, se investigó el efecto de la diabetes insulino-deficiente así como su tratamiento sobre el potencial osteogénico de CPMO y en la microarquitectura femoral. Los animales diabéticos mostraron niveles significativamente aumentados de glucemia, trigliceridemia,

fructosamina plasmática y $\text{TNF}\alpha$ plasmático, mientras que la insulinemia se encontró significativamente disminuida (sección III. 3., Tabla III. 3. 1.). Este perfil sérico es compatible con un estado diabético asociado a la destrucción parcial de las células β pancreáticas y la consecuente inducción de un estado inflamatorio. El tratamiento con metformina en ratas diabéticas previno parcialmente la hiperglucemia y la hipertrigliceridemia, pero mostraron control metabólico deficiente y estrés inflamatorio evidenciado por los altos niveles de $\text{TNF}\alpha$. El incremento en esta citoquina pro-inflamatoria, junto con otras, se asocia con osteoporosis [Zupan, 2013]. La hiperglucemia sostenida de la diabetes produce un incremento de los productos de glicación avanzados (AGEs), citoquinas y estrés oxidativo, lo que podría estar afectando el destino de las CPMO. En animales no diabéticos, el tratamiento con metformina no modificó los parámetros bioquímicos.

Para investigar los mecanismos por los cuales la diabetes afecta la formación ósea, realizamos una serie de estudios con CPMO provenientes de cuatro grupos experimentales (control y diabetes con o sin tratamiento con metformina). Los resultados demostraron que las CPMO de animales diabéticos presentaban una capacidad de diferenciarse a osteoblastos disminuida (sección III. 3. 1, figuras III.3.1 y III. 3.2). Estos resultados se asociaron con una disminución en el factor de transcripción osteoblástico Runx2 y con el incremento en la expresión del factor de transcripción adipogénico PPAR γ (figura III. 3. 1. 3), observándose una disminución de la relación Runx2/PPAR γ lo cual puede ser interpretado como una reducción en el potencial osteogénico de las células (Tabla III. 3 .1.). Todas estas alteraciones en la inducción osteogénica fueron completamente prevenidas cuando las ratas diabéticas recibieron tratamiento oral con metformina durante 2 semanas, y la relación Runx2/PPAR γ se revirtió parcialmente. Esto condice con la relación entre la metformina y la activación de AMPK, la cual induce la diferenciación osteoblástica descrita previamente en la sección III. 1. 3. C y por otros autores [Kanazawa, 2008; Shah, 2010].

Individuos que han padecido diabetes durante mucho tiempo, muestran un incremento en la acumulación de AGEs que son reconocidos por su receptor RAGE el cual se expresa en varios tipos celulares [Kulkarni, 2013]. Nuestro grupo ha demostrado previamente que la expresión de RAGE en osteoblastos MC3T3-E1 y UMR106 está regulada por la presencia de AGEs y, que la metformina puede prevenir *in vitro* la regulación del RAGE mediada por los AGEs en osteoblastos en cultivo [Cortizo, 2006]. Muy recientemente, se ha descrito que la incubación *in vitro* de CPMO con AGEs durante la diferenciación osteoblástica, incrementa la expresión de

RAGE y disminuye la expresión de Runx2 [Kim S, 2013]. Para evaluar el posible mecanismo por el cual la hiperglucemia diabética altera las características óseas, en esta tesis se investigó la expresión de RAGE en las CPMO obtenidas de animales de los cuatro grupos experimentales. Se encontró que la diabetes indujo un incremento significativo de la expresión de este receptor, tanto antes como luego de diferenciar las células durante 15 días a osteoblastos (Sección III. 3. 1. C.; Figura III. 3. 1. 4.). Este incremento fue prevenido cuando los animales diabéticos fueron tratados durante 2 semanas con metformina. Se ha descrito en células MC3T3-E1, que la activación del RAGE inhibe las vías de Wnt, PI3K y ERK, tres vías implicadas en la diferenciación osteoblástica [Chen, 2013; Maeda, 2013; Li, 2012]. En especial, la activación de RAGE inhibe la señalización de las ERK [Li, 2012], las cuales son capaces de reducir la actividad transcripcional de PPAR γ al fosforilarlo [Kim E, 2012]. También se sabe que las ERK aumentan la expresión de Runx2 [Wang, 2013] y que en pre-adipocitos 3T3-L1 el RAGE regula directamente la adipogénesis y la hipertrofia de dichas células [Monden, 2013].

Estos hallazgos se pueden relacionar con los resultados de esta tesis en los cuales se encontró que en CPMO provenientes de ratas diabéticas existe una expresión aumentada RAGE y PPAR γ mientras que disminuye la expresión de Runx2 (Figuras III. 3. 1. 3. y III. 3. 1. 4), dando como resultado una disminución en la capacidad osteoblastogénica y favoreciendo la diferenciación hacia el linaje adipocítico de dichas células, como se verifica en el análisis histológico de los fémures (Figura III. 3. 2. 1.). El tratamiento oral con metformina de los animales diabéticos previno el incremento de los niveles de RAGE y PPAR γ .

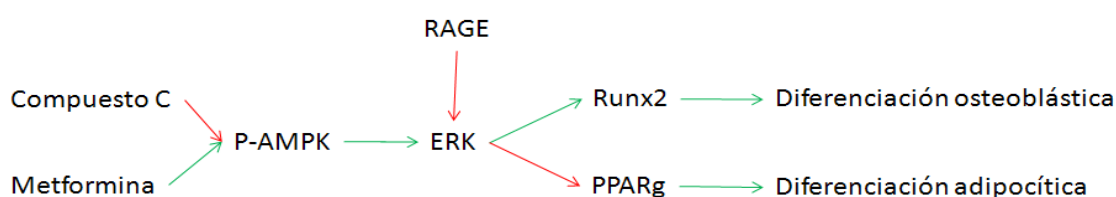


Figura IV. 2. Moléculas implicadas en la diferenciación de CPMO. flechas en verde: activación; flechas en rojo: inhibición [Cortizo, 2006; Kanazawa, 2008; Molinuevo 2010; Kim, 2012; Li, 2012].

El análisis histomorfométrico de los fémures mostró una disminución del hueso trabecular de la metáfisis femoral junto con una importante disminución en la densidad osteocítica (Sección III. 3. 2, Tabla III. 3. 3.); así como también se encontró un aumento significativo de la adiposidad de la médula ósea en los animales diabéticos. En conjunto, estas

alteraciones terminan afectando y contribuyendo con el deterioro en la calidad ósea. La sobreexpresión de PPAR γ estimula la diferenciación adipocítica de CPMO, mientras que la haploinsuficiencia de PPAR γ ha sido asociada con incremento en la masa ósea a través de la estimulación de la osteoblastogénesis [Akune, 2004]. Estos resultados podrían explicar la disminución en el potencial osteogénico de CPMO y la presencia de adipocitos en la médula ósea de ratas diabéticas; las alteraciones histomorfométricas que hemos observado en este modelo podrían también estar relacionadas con la disminución en el potencial osteogénico en favor del potencial adipogénico. Las observaciones de este trabajo se condicen con las encontradas por otros grupos sobre la microarquitectura ósea, analizadas por micro tomografía computada pero en modelos animales de ratones con diabetes tipo 1 [Kogianni, 2007; Nuttall, 2004].

La altura de la placa de crecimiento depende de dos procesos antagónicos: uno en dirección de la epífisis hacia la metáfisis que implica la producción, proliferación e hipertrofia de los condrocitos; y otro en la dirección opuesta el cual representa la invasión vascular y la sustitución de cartílago por hueso nuevo. Este último proceso requiere de la actividad osteoclástica. Los osteoclastos preparan la zona para que los osteoblastos depositen allí matriz ósea nueva. De esta manera los resultados obtenidos, muestran una disminución en el área TRAP y una reducción en la altura de la placa de crecimiento (Tabla III. 3. 3.), que analizados en forma conjunta, correlacionarían con una disminución en el crecimiento longitudinal del hueso. Otros autores, empleando modelos similares encontraron resultados equivalentes. Silva encontró un descenso significativo en la altura de la placa de crecimiento, pero no determinó la actividad TRAP [Silva, 2009]. Por otro lado, otros investigadores han encontrado en cultivos de células madres hematopoyéticas provenientes de ratas diabéticas, niveles incrementados de citoquinas relacionadas con la maduración osteoclástica (TNF α , MCS-F, y RANKL) y actividad TRAP aumentada. Estos procesos podrían asociarse con el incremento en la fragilidad de huesos largos y la disminución de reparaciones óseas. [Kawashima, 2009; Kayal, 2007]. En conclusión, si bien los resultados respecto a la actividad TRAP son contradictorios, todos se asocian al incremento en la fragilidad y disminución de la reparación de lesiones óseas.

La red de osteocitos es crítica para la salud ósea, ya que estas células actúan como mecanosensores y regulan el remodelamiento óseo [Zeliha Hekimsoy, 2008]. La pérdida de osteocitos por apoptosis como consecuencia de la inducción de la diabetes ha sido previamente registrada por otros investigadores [Molinuevo 2010; Portal-Núñez, 2010]. Se ha postulado que la apoptosis de osteocitos libera señales que activan a los osteoclastos con la consiguiente resorción ósea [Bidwell, 2008]. Una de estas señales es la de la proteína HMGB1 (High Mobility

Group Box 1) que regula la expresión de citoquinas proinflamatorias al interactuar con diferentes receptores, incluido el RAGE, para el cual es su ligando fisiológico. La diabetes está asociada al estrés oxidativo, el cual puede ser uno de los principales inductores de la apoptosis de los osteocitos [Manolagas, 2010; Stolzinger, 2010]. Se ha descrito que la unión AGEs - RAGE induce la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), e incrementa la generación de citoquinas proinflamatorias [Kulkarni, 2013], que podrían ser la causa de la disminución en la densidad osteocítica observada en nuestro modelo animal (Tabla III. 3. 3.).

Este modelo pone de manifiesto el efecto directo de la metformina sobre el hueso, en vez de actuar por un mecanismo insulinosensibilizante. Luego de dos semanas de tratamiento oral con metformina, la droga fue capaz de prevenir la disminución en el área trabecular y la adiposidad de la médula ósea; incrementó la densidad osteocítica en las trabéculas y el área con actividad TRAP en la esponjosa primaria, tanto en animales diabéticos como controles. A su vez previno parcialmente la disminución de la altura de la placa de crecimiento en animales diabéticos.

Todos estos resultados permiten concluir que este modelo empleado de diabetes con deficiencia de insulina produce efectos nocivos sobre la microarquitectura de huesos largos que podría estar relacionado con la disminución en el potencial osteogénico de CPMO. El cual, a su vez, podría estar mediado por una disminución en los niveles de Runx2, un aumento en los de PPAR γ y un aumento en citoquinas pro-inflamatorias (TNF α) regulados por RAGE. Estas alteraciones inducidas por la diabetes pueden ser total o parcialmente prevenidas por el tratamiento oral con metformina.

CONCLUSIONES



- La metformina promueve la diferenciación osteoblástica, proceso mediado a través de la activación/fosforilación de la proteína AMPK y del aumento en la expresión de Runx2.
 - La rosiglitazona es un inductor de adipogénesis. A su vez, disminuye la diferenciación osteoblástica mediante la disminución en la expresión del Runx2 y el aumento en la expresión del PPAR γ .
 - La metformina inhibe la inducción adipogénica inducida por rosiglitazona.
 - La metformina incrementa la resorción y formación ósea, estimulando en definitiva el recambio óseo.
 - La rosiglitazona inhibe el recambio óseo proceso que es revertido por el tratamiento con metformina.
-
- La diabetes con deficiencia en la secreción de insulina disminuye el potencial osteogénico de CPMO, fenómeno que es revertido parcialmente por el tratamiento oral con metformina. Este proceso es mediado por la disminución en la relación Runx2/PPAR γ .
 - La diabetes induce alteraciones en la microarquitectura ósea, y estos defectos estarían asociados con la disminución en el potencial osteogénico de las CPMO. Esta situación fue revertida por el tratamiento oral con metformina.
 - En conjunto, estos resultados sugerirían que la diabetes afecta la calidad del hueso, lo cual, podría asociarse con un aumento en el riesgo de fracturas.

BIBLIOGRAFÍA



A

Achemlal L, Tellal S, Rkiouak F, Nouijai A, Bezza A, Derouiche el M, Ghafir D, El Maghraoui A. (2005) Bone metabolism in male patients with type 2 diabetes. *Clin Rheumatol.*;24(5):493-6.

Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, Evans RM (2013). PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med.*;19(5):557-66.

Andújar-Plata P, Pi-Sunyer X, Laferrère B.(2012). Metformin effects revisited. *Diabetes Res Clin Pract.*;95(1):1-9.

Akune, T., Ohba, S., Kamekura, S., Yamaguchi, M., Chung, U., Kubota, N., Kawaguchi, H. (2004). PPAR γ insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest*;113(6):846-55.

Arias-Díaz, Balibrea J.(2007). Animal models in glucose intolerance and type-2 diabetes. *Nutr Hosp.*;22(2):160-8

B

Bäckesjö, C.-M., Li, Y., Lindgren, U., & Haldosén, L.-A. (2009). Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *Cells, tissues, organs*, 189(1-4), 93–7. doi:10.1159/000151744

Banse X, Devogelaer JP, Lafosse A, Sims TJ, Grynepas M, Bailey AJ (2002)..Cross-link profile of bone collagen correlates with structural organization of trabeculae. *Bone.*;31(1):70-6

Baynes JW 1991 Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*;40(4):405-12.

Bidwell, J. P., Yang, J., & Robling, A. G. (2008). Is HMGB1 an osteocyte alarmin? *Journal of cellular biochemistry*, 103(6), 1671–80. doi:10.1002/jcb.21572

Born AK, Rottmar M, Lischer S, Pleskova M, Bruinink A, Maniura-Weber K.(2009). Correlating cell architecture with osteogenesis: first steps towards live single cell monitoring. *Eur Cell Mater.*;18:49-60, 61-2; discussion 60.

Bonfanti R, Mora S, Prinster C, Bognetti E, Meschi F, Puzzovio M, Proverbio MC, Chiumello G.(1997). Bone modeling indexes at onset and during the first year of follow-Up in insulin-dependent diabetic children. *Calcif Tissue Int*; 60(5):397-400.

Bradford MM.(1976)Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*; 72, 248-254

Bristol-Myers Squibb.U.S. (2008). Food and Drug Administration.Glucophage (metformin hydrochloride tablets) Label Information;

Burghardt A, Issever A, Schwartz A, et al (2012). High-resolution peripheral quantitative computed tomographic imaging of cortical and trabecular bone microarchitecture in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.*; 95:5045–55.

C

Cai, W., Ramdas, M., Zhu, L., Chen, X. et al. (2012). Oral advanced glycation endproducts (AGEs) promote insulin resistance and diabetes by depleting the antioxidant defenses AGE receptor-1 and sirtuin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012, 109, 15888–15893.

Cameron NE, Cameron NE, Cotter MA. (1997) Metabolic and vascular factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetes.*, 46(2), S31-S37

Cells, P., Chen, L., Huang, M., & Tan, J. (2013). PI3K / AKT Pathway Involvement in the Osteogenic Effects of Osteoclast Culture Supernatants, 00(00), 1–7. doi:10.1089/ten.tea.2012.0469

Chan GK, Duque G. (2002). Age-related bone loss: old bone, new facts. *Gerontology*; 48: 62–71.

Tissue Eng Part A. 2013 Oct;19(19-20):2226-32. doi: 10.1089/ten.TEA.2012.0469. Epub 2013 May 30.

Chen LL, Huang M, Tan JY, Chen XT, Lei LH, Wu YM, Zhang DY. (2013). PI3K/AKT Pathway Involvement in the Osteogenic Effects of Osteoclast Culture Supernatants on Preosteoblast Cells. *Tissue Eng Part A.*;19(19-20):2226-32.

Christensen MM, Brasch-Andersen C, Green H, Nielsen F, Damkier P, Beck-Nielsen H, Brosen K. (2011). The pharmacogenetics of metformin and its impact on plasma metformin steady-state levels and glycosylated hemoglobin A1c. *Pharmacogenet Genomics*;21(12):837-50.

Chua SC, Jr., Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, (1996). Tartaglia L y cols. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science* ;271 (5251): 994-6.

Clark JB, Palmer CJ, Shaw WN (1983). The diabetic Zucker fatty rat. *Proc Soc Exp Biol Med.*;173(1):68-75.

Clarke B (2008) Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol. Suppl* 3:S131-9.

Cohen MM Jr. (2009). Perspectives on RUNX genes: an update. *Am J Med Genet A.*;149A(12):2629-46.

Colnot, C., Huang, S., & Helms, J. (2006). Analyzing the cellular contribution of bone marrow to fracture healing using bone marrow transplantation in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 350(3), 557–561.

Cortizo AM, Etcheverry SB. (1995). Vanadium derivatives act as growth factor--mimetic compounds upon differentiation and proliferation of osteoblast-like UMR106 cells. *Mol Cell Biochem.* 145, 97-102

Cortizo AM, Lettieri MG, Barrio DA, Mercer N, Etcheverry SB, McCarthy AD.(2003) Advanced glycation end-products (AGEs) induce concerted changes in the osteoblastic expression of their receptor RAGE and in the activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK). *Mol Cell Biochem.*;250(1-2):1-10.

Cortizo, A. M., Sedlinsky, C., McCarthy, A. D., Blanco, A., & Schurman, L. (2006). Osteogenic actions of the anti-diabetic drug metformin on osteoblasts in culture. *European journal of pharmacology*, 536(1-2), 38–46. doi:10.1016/j.ejphar.2006.02.030

D

Dallas SL, Bonewald LF.(2010). Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. *Ann N Y Acad Sci.* 1192:437-43.

Diabetes Control and Complications Trial (DCCT): Design and Methodologic Considerations for the Feasibility Phase,(1986). *Diabetes* vol. 35 no. 5 530-545

Diagnosis and classification of diabetes mellitus.(2013). *Diabetes Care* vol. 36 no. Supplement 1 S67-S74

DalleCarbonare L, Innamorati G, Valenti MT (2012). Transcription factor Runx2 and its application to bone tissue engineering. *Stem Cell Rev.*;8(3):891-7.

F

Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Mayani H.(2006) Mesenchymal stem cell; history, biology and clinical application. *Rev Invest Clin.*;58(5):498-511

Forbes JM, Soldatos G, Thomas MC.(2005). Below the radar: advanced glycation end products that detour "around the side". Is HbA1c not an accurate enough predictor of long term progression and glycaemic control in diabetes? *Clin Biochem Rev.*;26(4):123-34.

Garnero P, Borel O, Gineyts E, Duboeuf F, Solberg H, Bouxsein ML, Christiansen C, Delmas PD (2006). Extracellular post-translational modifications of collagen are major determinants of biomechanical properties of fetal bovine cortical bone. *Bone* 38: 300-309.

G

Gao, Y., Xue, J., Li, X., Jia, Y., & Hu, J. (2008). Metformin regulates osteoblast and adipocyte differentiation of rat mesenchymal stem cells. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 60(12), 1695–700. doi:10.1211/jpp.60/12.0017

Garnero P, Borel O, Gineyts E, Duboeuf F, Solberg H, Bouxsein ML, Christiansen C, Delmas PD.(2006). Extracellular post-translational modifications of collagen are major determinants of biomechanical properties of fetal bovine cortical bone. *Bone*, 38, 300-309

Geneser F,(2006). *Histología sobre bases biomoleculares*. 3ra edición, 6ta reimpresión. Editorial: Médica Panamericana.

Gong L, Goswami S, Giacomini KM, Altman RB, Klein TE. (2012). Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics.*; 22(11):820-7. doi: 10.1097/FPC.0b013e3283559b22.

Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, et al (2011). Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet*; 50:81–98.

Grey A, Bolland M, Gamble G, Wattie D, Horne A, Davidson J, Reid IR.(2007) The peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone decreases bone formation and bone mineral density in healthy postmenopausal women: a randomized, controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.*;92:1305–10.

Grey A.(2008). Thiazolidinedione-induced skeletal fragility--mechanisms and implications. *Diabetes Obes Metab.*;11(4):275-84.

Gruntmanis U, Fordan S, Ghayee HK, Abdullah SM, See R, Ayers CR, McGuire DK.(2010). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone increases bone resorption in women with type 2 diabetes: a randomized, controlled trial. *Calcif Tissue Int.*;86:343–9.

Gundberg CM, Anderson M, Dickson I, Gallop PM.(1986). "Glycated" osteocalcin in human and bovine bone. The effect of age. *J Biol Chem.*, 261, 14557-14561

Guthrie RM (2012). Evolving therapeutic options for type 2 diabetes mellitus: an overview. *Postgrad Med.*;124(6):82-9.

H

Heap J, Murray MA, Miller SC, Jalili T, Moyer-Mileur LJ. (2004). Alterations in bone characteristics associated with glycemic control in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr.*,144, 56-62

Henriksen K, Neutzsky-Wulff AV, Bonewald LF, Karsdal MA.(2009). Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone.*;44(6):1026-33.

Hernandez CJ, Tang SY, Baumbach BM, Hwu PB, Sakkee AN, van der Ham F, DeGroot J, Bank RA, Keaveny TM. (2005). Trabecular microfracture and the influence of pyridinium and non-enzymatic glycation-mediated collagen cross-links. *Bone*, 37, 825-832

Hotta N.(1995). New approaches for treatment in diabetes: aldose reductase inhibitors. *Biomed Pharmacoter.*, 49, 232-243

I

Igel M, Becker W, Herberg L, Joost HG.(1997). Hyperleptinemia, leptin resistance, and polymorphic leptin receptor in the New Zealand obese mouse. *Endocrinology.*;138(10):4234-9..

Ishii H, Daisuke K, King JL.(1998). Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *JMolMed.*, 76, 21-31

Isidro ML, Ruano B.(2010). Bone disease and Diabetes. *Current Diabetes Reviews.*, 6 (3), 144-155

J

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP (1997) Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64: 295-312.

Jang, W. G., Kim, E. J., Lee, K.-N., Son, H.-J., & Koh, J.-T. (2011). AMP-activated protein kinase (AMPK) positively regulates osteoblast differentiation via induction of Dlx5-dependent Runx2 expression in MC3T3E1 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 404(4), 1004–9. doi:10.1016/j.bbrc.2010.12.099

Jang WG, Kim, E.J. Bae, I.H., Lee, K.N., Kim, D.K., Kim, S.H., Lee, C.H., Franceschi, R.T., Choi, H.S, Koh, J.T. Metformin induce osteoblast differentiation via orphan nuclear receptor SHP-mediated transactivation of runx. *Bone* 48, 885-893.

Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC et al.(2007). Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Am J Epidemiol* 166: 495–505.,

Jay D, Hitomi H, Griending KK.(2006). Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic Biol Med*, 40, 183-192

Johnell O, Kanis JA, Oden A et al.(2004). Mortality after osteoporotic fractures.*Osteoporos Int*; 15: 38–42.

K

Kanazawa, I., Yamaguchi, T., Yano, S., Yamauchi, M., & Sugimoto, T. (2008). Metformin enhances the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells via AMP kinase activation as well as eNOS and BMP-2 expression. *Biochemical and biophysical research communications*, 375(3), 414–9. doi:10.1016/j.bbrc.2008.08.034

Kahn, S.E., Zinman, B., Lachin, J.M., Haffner, S.M., Herman, W.H., Holman, R.R., Kravitz, B.G., Yu, D., Heise, M.A., Aftring, R.P., Viberti, G., (2008). Diabetes Outcome Progression Trial (ADOPT) Study Group. Rosiglitazone-associated fractures in type 2 diabetes: an Analysis from A Diabetes Outcome Progression Trial (ADOPT).*Diabetes Care* 31, 845–851

Kawaguchi, H., Akune, T., Yamaguchi, M., Ohba, S., Ogata, N., Chung, U., ... Nakamura, K. (2005). Distinct effects of PPARgamma insufficiency on bone marrow cells, osteoblasts, and osteoclastic cells. *Journal of bone and mineral metabolism*, 23(4), 275–9. doi:10.1007/s00774-005-0599-2

Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Natori T.(1992) Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes*; 41 (11): 1422-8.

- Kawashima, Y., Fritton, J. C., Yakar, S., Epstein, S., Schaffler, M. B., Jepsen, K. J., & LeRoith, D. (2009). Type 2 diabetic mice demonstrate slender long bones with increased fragility secondary to increased osteoclastogenesis. *Bone*, 44(4), 648–55. doi:10.1016/j.bone.2008.12.012
- Kayal, R. A., Tsatsas, D., Bauer, M. A., Allen, B., Al-sebaei, M. O., Kakar, S., ... Graves, D. T. (2007). Diminished Bone Formation During Diabetic Fracture Healing Is Related to the Premature Resorption of Cartilage Associated With Increased Osteoclast Activity, 22(4), 560–568. doi:10.1359/JBMR.070115
- Kayath MJ, Tavares EF, Dib SA, Vieira JGH.(1998). Prospective bone mineral density evaluation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabetes Complications.*, 12, 133
- Kemink SA, Hermus AR, Swinkels LM, Lutterman JK, Smals AG.(2000). Osteopenia in insulin-dependent diabetes mellitus; prevalence and aspects of pathophysiology. *J Endocrinol Invest.*, 23, 295-303
- Kemink SA, Hermus AR, Swinkels LM, Lutterman JK, Smals AG.(2000). Osteopenia in insulin-dependent diabetes mellitus; prevalence and aspects of pathophysiology. *J Endocrinol Invest.*, 23, 295-303
- Kim, E.-K., Lim, S., Park, J.-M., Seo, J. K., Kim, J. H., Kim, K. T. Suh, P.-G. (2012). Human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by AMP-activated protein kinase. *Journal of cellular physiology*, 227(4), 1680–7.
- Kim M, Kim C, Choi YS, Kim M, Park C, Suh Y.(2012). Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift indifferntiation from osteogenic to adipogenic potential: Implication to age-associated bone diseases and defects. *Mecanisms of ageing and development*.
- Kim S, Kwon J.(2013). COMP-Ang1 inhibits apoptosis as well as improves the attenuated osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by advanced glycation end products. *Biochim Biophys Acta.*;1830(10):4928-34.
- Kogianni, G., & Noble, B. S. (2007). The biology of osteocytes. *Current osteoporosis reports*, 5(2), 81–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17521510>
- Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED.(1998). High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest.*, 101(1), 160–169
- Kulkarni MJ, Korwar AM, Mary S, Bhonsle HS, Giri AP.(2013) Glycated proteome: from reaction to intervention. *Proteomics Clin Appl.*;7(1-2):155-70
- Kume, S., Kato, S., Yamagishi, S., Inagaki, Y., Ueda, S., Arima, N., ... Nagata, K. (2005). Advanced glycation end-products attenuate human mesenchymal stem cells and prevent cognate differentiation into adipose tissue, cartilage, and bone. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 20(9), 1647–58. doi:10.1359/JBMR.050514
- Kung, J., & Henry, R. R. (2012). Thiazolidinedione safety. *Expert opinion on drug safety*, 11(4), 565–79. doi:10.1517/14740338.2012.691963

L

Lecka-Czernik, B., Moerman, E. J., Grant, D. F., Lehmann, J. M., Manolagas, S. C., & Jilka, R. L. (2002). Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. *Endocrinology*, *143*(6), 2376–2384.

Lecka-Czernik B, Ackert-Bicknell C, Adamo ML, Marmolejos V, Churchill GA, Shockley KR, Reid IR, Grey A, Rosen CJ.(2007). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) by rosiglitazone suppresses components of the insulin-like growth factor regulatory system in vitro and in vivo. *Endocrinology*.;148(2):903-11. Epub 2006 Nov 22.

Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA.(1995). An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem*.;270(22):12953-6. PubMed PMID: 7768881.Li Gong 2012

Li, G., Xu, J., & Li, Z. (2012). Receptor for advanced glycation end products inhibits proliferation in osteoblast through suppression of Wnt, PI3K and ERK signaling. *Biochemical and biophysical research communications*, *423*(4), 684–9. doi:10.1016/j.bbrc.2012.06.015

Lipscombe LL, Jamal SA, Booth GL et al.(2007). The risk of hip fractures in older individuals with diabetes: a population-based study. *Diabetes Care* ; 30: 835–841.

Liu TM, Lee EH. (2013). Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development. *Tissue Eng Part B Rev*.;19(3):254-63

Lott, J.A., Turner, K. (1975). Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. *Clin. Chem.* 21, 1754–1760

Llusá M., Meri À., Ruano D. Manual y Atlas Fotográfico de Anatomía del Aparato Locomotor. Editorial Médica Panamericana.

Lund, S. S., Tarnow, L., Astrup, A. S., Hovind, P., Jacobsen, P. K., Alibegovic, A. C., ... Vaag, A. A. (2008). Effect of adjunct metformin treatment in patients with type-1 diabetes and persistent inadequate glycaemic control. A randomized study. *PloS one*, *3*(10), e3363. doi:10.1371/journal.pone.0003363

Lyons TJ, Jenkins AJ.(1997) Glycation, oxidation and lipoxidation in the development of the complications of diabetes: a carbonyl stresshypothesis. *Diabetes Rev.*, 5, 365-391

M

Mai QG, Zhang ZM, Xu S, Lu M, Zhou RP, Zhao L, Jia CH, Wen ZH, Jin DD, Bai XC (2011). Metformin stimulates osteoprotegerin and reduces RANKL expression in osteoblasts and ovariectomized rats. *J Cell Biochem.* 2011;112:2902–9.

Maeda, K., Takahashi, N., & Kobayashi, Y. (2013). Roles of Wnt signals in bone resorption during physiological and pathological states. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, *91*(1), 15–23. doi:10.1007/s00109-012-0974-0

Malaval L, Liu F, Roche P, Aubin JE (1999) Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *J Cell Biochem* 74: 616-627.

Manolagas, S. C. (2010). From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocrine reviews*, 31(3), 266–300. doi:10.1210/er.2009-0024

McCarthy AD, Etcheverry SB, Bruzzone L, Cortizo A.M.(1997). Effects of advanced glycation endproducts on the proliferation and differentiation of osteoblast like cells. *Mol. Cell Biochem.*, 170, 43–51

McCarthy AD, Etcheverry SB, Cortizo AM.(1999). Advanced glycation endproduct specific receptors in rat and mouse osteoblast-like cells: regulation with stages of differentiation. *Acta Diabetol.*, 36, 45–52

McCarthy AD, Etcheverry SB, Cortizo AM.(2001). Effect of advanced glycation endproducts on the secretion of insulin-like growth factor-I and its binding proteins: role in osteoblast development. *Acta Diabetol.*, 38, 113-122

McCarthy AD, Uemura T, Etcheverry SB, Cortizo AM.(2004). Advanced glycation endproducts interfere with integrin-mediated osteoblastic attachment to a type-I collagen matrix. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004, 36, 840-848

Melton LJ, Leibson CL, Achenbach SJ, Thorneau TM, Khosla S. (2008). Fracture risk in type 2 diabetes: update of a population-based study. *J Bone Miner Res.*;23:1334–42.

Molinuevo, M. S., Schurman, L., McCarthy, A. D., Cortizo, A. M., Tolosa, M. J., Gangoiti, M. V., ... Sedlinsky, C. (2010). Effect of metformin on bone marrow progenitor cell differentiation: in vivo and in vitro studies. *J Bone Miner Res*, 25(2), 211–221. doi:10.1359/jbmr.090732

Morrison RF, Farmer SR. (2000). Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr.*;130(12):3116S-3121S.

Monden, M., Koyama, H., Otsuka, Y., Morioka, T., Mori, K., Shoji, T., ... Inaba, M. (2013). Receptor for advanced glycation end products regulates adipocyte hypertrophy and insulin sensitivity in mice: involvement of Toll-like receptor 2. *Diabetes*, 62(2), 478–89. doi:10.2337/db11-1116

Montagnani, A., Gonnelli, S.,(2013).Antidiabetic therapy effects on bone metabolism and fracture risk. *Diabetes Obes Metab.*;15(9):784-91.

Mundy GR. Osteoblasts, bone formation and mineralization. En: Fogelman I, editor. Bone remodeling and its disorders. London: Martin Dunitz; 1995. p. 28-9.

N

Nuttall, M. E., & Gimble, J. M. (2004). Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications, 290–294. doi:10.1016/j.coph.2004.03.002

O

Odetti P, Rossi S, Monacelli F, Poggi A, Cirnigliaro M, Federici M, Federici A.(2005). Advanced glycation end products and bone loss during aging. *Ann NY Acad Sci*, 1043: 710-717

Oreffo RO, Cooper C, Mason C, Clements M. (2005). mesenchymal stem cells - lineage, plasticity and skeletal therapeutic potential. *stem cell Rev.*;1(2):169-78.

P

Pace C, Delmo C, Lee R. (1989). Altered electrical responses of B-cells after goldthioglucose-induced lesions in the ventromedial hypothalamus. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.*;65(3):401-4.

Pfeiffer A, Schatz H.(1995). Diabetic microvascular complications and growth factors. *ExpClinEndocrinolDiabetes.*, 103, 7-14

Portal-Núñez, S., Lozano, D., de Castro, L. F., de Gortázar, a R., Nogués, X., & Esbrit, P. (2010). Alterations of the Wnt/beta-catenin pathway and its target genes for the N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein in bone from diabetic mice. *FEBS letters*, 584(14), 3095–100. doi:10.1016/j.febslet.2010.05.047

Q

Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ.(1992). Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res.*, 7, 683-692

R

Raggatt LJ, Partridge NC.(2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem.*;285(33):25103-8.

Ross M.H., Pawlina W. *Histología: Texto y Atlas Color con Biología Molecular y Celular*. 5ta Ed. Editorial Médica Panamericana; 2007.

S

Saito M, Fujii K, Mori Y, Marumo K. (2006). Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats. *Osteoporos*, 17, 1514-1523

Saito M, Marumo K.(2010). Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporos Int.*, (2), 195- 214

Schmidt-Nielsen K, Haines HB, Hackel DB.(1964). Diabetes mellitus in the sand rat induced by standard laboratory diets.*science*;143(3607):689-90.

- Schurman L, McCarthy AD, Sedlinsky C, Gangoiti MV, Arnol V, Cortizo AM. (2008). Metformin, an antidiabetic agent, inhibits advanced glycation end product(AGE)-induced deleterious effects in osteoblast-like cells by suppressing oxygen species generation, apoptosis and AGE-receptor upregulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*; 116, 333-340
- Sedlinsky, C., Molinuevo, M. S., Cortizo, A. M., Tolosa, M. J., Felice, J. I., Sbaraglini, M. L., ... McCarthy, A. D. (2011). Metformin prevents anti-osteogenic in vivo and ex vivo effects of rosiglitazone in rats. *Eur J Pharmacol*, 668(3), 477–485. doi:10.1016/j.ejphar.2011.07.033
- Shah, M., Kola, B., Bataveljic, a, Arnett, T. R., Viollet, B., Saxon, L., Chenu, C. (2010). AMP-activated protein kinase (AMPK) activation regulates in vitro bone formation and bone mass. *Bone*, 47(2), 309–19. doi:10.1016/j.bone.2010.04.596
- Sharma K, Ziyadeth FN.(1997). Biochemical events and cytokine interactions linking glucose metabolism to the development of diabetic nephropathy. *SemNephrol*. 17, 80-92
- Sharp PS, Rainbow S, Mukherjee S. (2003). Serum levels of low molecular weight advanced glycation end products in diabetic subjects. *Diabet Med.*, 20, 575-579
- Silva, M. J., Brodt, M. D., Lynch, M. A., Mckenzie, J. A., Tanouye, K. M., Nyman, J. S., & Wang, X. (2009). Type 1 Diabetes in Young Rats Leads to Progressive Trabecular Bone Loss, Cessation of Cortical Bone Growth, and Diminished Whole Bone Strength and Fatigue Life, 24(9), 1618–1627. doi:10.1359/JBMR.090316
- Spencer ND, Gimble JM, Lopez MJ.(2011). Mesenchymal stromal cells: past, present, and future. *Vet Surg.*;40(2):129-39
- Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P.(2005). Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res.*;52(4):313-20.
- Starup-Linde, J. (2013). Diabetes, biochemical markers of bone turnover, diabetes control, and bone. *Frontiers in endocrinology*, 4(March), 21. doi:10.3389/fendo.2013.00021
- Stein, G. S. & Lian, J. B. (1993). Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev.*; 14, 424-442
- Stolzing, A., Sellers, D., Llewelyn, O., & Scutt, A. (2010). Diabetes induced changes in rat mesenchymal stem cells. *Cells, tissues, organs*, 191(6), 453–65. doi:10.1159/000281826
- Szkudelski, T. (2012). Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 237(5), 481–90. doi:10.1258/ebm.2012.011372

T

Tahara A, Matsuyama-Yokono A, Nakano R, Someya Y, Shibasaki M.(2008). Hypoglycaemic effects of antidiabetic drugs in streptozotocin-nicotinamide-induced mildly diabetic and streptozotocin-induced severely diabetic rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*;103(6):560-8

Testut, Latarjet. Tratado de anatomía humana. 9na edición 1983.

Tortora, Derrickson. Principios de Anatomía y Fisiología. 11va Ed. Editorial Médica Panamericana; 2011 Tuominen 1999

Tuominen JT, Impivaara O, Puukka P, Rönnemaa T.(1999). Bone mineral density in patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care.*, 22, 1196-1200

Tropel P, Noël D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F.(2004). Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res.*;295(2):395-406.

Tullberg-Reinert, H. & Jundt, G.(1999). In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a sirius red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor beta2 and ascorbic acid 2-phosphate. *Histochem Cell Biol*, 112, 271-276

Tzoulaki, I., Molokhia, M., Curcin, V., Little, M.P., Millett, C.J., Ng, A., Hughes, R.I., Khunti, K., Ilkkins, M.R., Majeed, A., Elliott, P., (2009). Risk of cardiovascular disease and all cause mortality among patients with type 2 diabetes prescribed oral antidiabetes drugs: retrospective cohort study using UK general practice research database. *BMJ* 339, b4731.

U

Ueno, A.; Kitase, Y.; Moriyama, K. & Inoue, H.(2001). MC3T3-E1-conditioned medium-induced mineralization by clonal rat dental pulp cells. *Matrix Biol.* 20, 347-355.

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effects of intensive blood glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes. *Lancet* 1998, 352(9131), 854-865

V

Van Staa TP, Dennison EM, Leufkens HG, Cooper C. (2004). Epidemiology of fractures in England and Wales. *Bone.*;29:517–22.

Vashishth D. (2007). The role of the collagen matrix in skeletal fragility. *Curr Osteoporos Rep*, 5, 62-66

Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. (2005). Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk. *Diabetologia.*;48(7):1292-9.

Vella, S., Buetow, L., Royle, P., Livingstone, S., Colhoun, H. M., & Petrie, J. R. (2010). The use of metformin in type 1 diabetes: a systematic review of efficacy. *Diabetologia*, 53(5), 809–20. doi:10.1007/s00125-009-1636-9

Veroni MC, Proietto J, Larkins RG.(1991). Evolution of insulin resistance in New Zealand obese mice. *Diabetes*; 40 (11): 1480-7.

Viguet-Carrin S, Roux JP, Arlot ME, Merabet Z, Leeming DJ, Byrjalsen I, Delmas PD, Bouxsein ML. (2006). Contribution of the advanced glycation end product pentosidine and of maturation of type I collagen to compressive biomechanical properties of human lumbar vertebrae. *Bone*, 39, 1073-1079

Vlassara H. (1996). Advanced glycation end-products and atherosclerosis. *Ann Med*, 28, 419-426

Vlassara H. (1997). Recent progress in advanced glycation endproducts and diabetic complications. *Diabetes.*, 46(2), S19-S25

W

Wakasugi N, Tomita T, Kondo K.J (1967). Differences of fertility in reciprocal crosses between inbred strains of mice. DDK, KK and NC. *Reprod Fertil.*;13(1):41-50.

Wan Y, Chong LW, Evans RM.(2007). PPAR-gamma regulates osteoclastogenesis in mice. *Nat Med.*;13(12):1496-503.

Wan Y.(2010). PPAR γ in bone homeostasis. *Trends Endocrinol Metab.*;21(12):722-8

Wang, C., Lin, K., Chang, J., & Sun, J. (2013). Osteogenesis and angiogenesis induced by porous β -CaSiO₃/PDLGA composite scaffold via activation of AMPK/ERK1/2 and PI3K/Akt pathways. *Biomaterials*, 34(1), 64–77. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.09.021

Wang, H.N., Wang, Y.R., Liu, G.Q., Liu, Z., Wu, X.P., Wei, X.L., Hong, T.P., (2008). Inhibition of hepatic interleukin 18 production by rosiglitazone in a rat model of nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* 14, 7240–7246.

Wang X, Shen X, Li X, Agrawal CM. (2002) Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone*; 31, 1-7

Wei W, Wang X, Yang M, Smith LC, Dechow PC, Sonoda J, Evans RM, Wan Y.. (2010) PGC1 β mediates PPAR γ activation of osteoclastogenesis and rosiglitazone-induced bone loss. *Cell Metab.* 11, 503–516

WilliamsonJR, Chang K, Frangos M.(1993). Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes.*, 42, 801-813

Witztum JL.(1997) Role of modified lipoproteins in diabetic macroangiopathy. *Diabetes.*, 46 (2),S112-S114

Wan Y.(2010). PPAR γ in bone homeostasis. Trends Endocrinol Metab. Dec;21(12):722-8.

Y

Yang, W., Hong, Y.H., Shen, X.-Q., Frankowski, C., Camp, H.S., Leff, T., (2001). Regulation of transcription by AMP-activated protein kinase. J. Biol. Chem. 276, 38341–38344.

Z

Zeliha Hekimsoy.(2008). Osteocytes-The Known and Unknown. Turk Jem; 12: 23-7

Zhong, X., Xiu, L., Wei, G., Liu, Y., Su, L., Cao, X., Xiao, H. (2011). Bezafibrate enhances proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells via AMPK and eNOS activation. *Acta pharmacologica Sinica*, 32(5), 591–600. doi:10.1038/aps.2011.15

Zucker LM, Zucker TF. (1961). Fatty, a new mutation in the rat. *J. Hered.*; 52: 275-278.

Zupan J, Jeras M, Marc J.(2013). Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. *Biochem Med (Zagreb)*.;23(1):43-63.

Los resultados de esta tesis dieron lugar a los siguientes trabajos:

- Trabajos publicados en revistas científicas:

Molinuevo, M. S., Schurman, L., McCarthy, A. D., Cortizo, A. M., **Tolosa, M. J.**, Gangoiti, M. V., Sedlinsky, C. (2010). Effect of metformin on bone marrow progenitor cell differentiation: in vivo and in vitro studies. *J Bone Miner Res*, 25(2), 211–221. doi:10.1359/jbmr.090732

Sedlinsky, C., Molinuevo, M. S., Cortizo, A. M., **Tolosa, M. J.**, Felice, J. I., Sbaraglini, M. L., ... McCarthy, A. D. (2011). Metformin prevents anti-osteogenic in vivo and ex vivo effects of rosiglitazone in rats. *Eur J Pharmacol*, 668(3), 477–485. doi:10.1016/j.ejphar.2011.07.033

Tolosa MJ, Chuguransky SR, Schurman L, Sedlinsky C, Cortizo AM1, McCarthy AD, Molinuevo MS. (2012). La diabetes altera el potencial osteogénico de células progenitoras de médula ósea. efectos del tratamiento con metformina.. *Revista argentina de endocrinología y metabolismo*.

Tolosa MJ, Chuguransky SR, Sedlinsky C, Schurman L, McCarthy AD, Molinuevo MS, Cortizo AM. (2013). Insulin-deficient diabetes-induced bone microarchitecture alterations are associated with a decrease in the osteogenic potential of bone marrow progenitor cells: Preventive effects of metformin. *Diabetes Res Clin Pract.*;101(2):177-86

- Presentaciones a congresos:

1. “La Metformina revierte el estrés oxidativo y la apoptosis inducida por AGEs (productos de glicación avanzada) sobre osteoblastos en cultivo.”. McCarthy Antonio D, Sedlinsky Claudia, Cortizo Ana M, Bruzzone Liliana, Arnol Verónica, Felice Juan, Tolosa Maria J, Schurman León. XXIV Reunión Anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral. 15 al 18 de Agosto de 2007. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

2. “Efectos de los AGEs sobre las fibras de actina y la migración celular”. Arnol V., Felice J. I., Tolosa M. J., Cortizo A. M. XV Jornadas de Jóvenes Investigadores, Asociación de Universidades Grupo Montevideo (A.U.G.M.). 24 – 26 de Octubre de 2007. Universidad Nacional de Asunción, Paraguay.

3. “Efectos de los AGEs sobre las fibras de actina y la migración celular”. Arnol V., Felice J. I., Tolosa M. J., Cortizo A. M., McCarthy AD. Jornadas de Ciencia y Tecnología de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Noviembre de 2007. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

4. “Mecanismos de acción de AGEs (productos de glicación avanzada) y Alendronato sobre células osteoblásticas en cultivo: rol del calcio y el estrés oxidativo”. Gangoiti M. V., Arnol V., Felice J. I., Tolosa M. J., Cortizo A. M., McCarthy A. D. LII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica y LV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. 21 a 24 de Noviembre de 2007. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Presentación: Póster. *Revista Medicina*. Vol. 67 Supl. III-2007.

5. “In vitro effects of metformin and metformin - rosiglitazone co-treatment on rat mesenchymal progenitor cells” Sedlinsky C., Molinuevo MS., Tolosa MJ., McCarthy AD.,

Schurman L., Cortizo AM. The Endocrine Society's Annual Meeting 2008, San Francisco (EEUU), 15 – 18 Junio 2008.

6. “In vivo and in vitro effects of metformin on osteoblastic differentiation of bone marrow mesenchymal progenitor cells” Molinuevo MS., Sedlinsky C., Tolosa MJ., McCarthy AD., Schurman L., Cortizo AM. The Endocrine Society's Annual Meeting 2008, San Francisco (EEUU), 15 – 18 Junio 2008.

7. “Efectos in vitro y ex vivo de la metformina sobre células progenitoras de médula ósea”. Molinuevo MS, Leon Schurman, Antonio D. McCarthy, Ana M. Cortizo, María J. Tolosa, M. Virginia Gangoiti, Claudia Sedlinsky. VIII Congreso Argentino de Osteoporosis, VI Congreso de enfermedades del metabolismo óseo y mineral del Mercosur. Buenos Aires, 6-8 agosto, 2008.

8. “Metformin co-treatment reverts anti-osteogenic effects of rosiglitazone in rats” C Sedlinsky¹, MS Molinuevo¹, L Schurman¹, AD McCarthy¹, JI Felice¹, MV Gangoiti¹, MJ Tolosa¹ and AM Cortizo¹. The Endocrine Society's 91st Annual Meeting. EEUU. 10 a 13 de Junio de 2009.

9. “La metformina revierte los efectos anti-osteogénicos de la rosiglitazona in vivo y ex vivo en ratas”. Tolosa, María José; Molinuevo, M. Silvina; Sbaraglini, M. Laura; Felice, Juan Ignacio; Sedlinsky, Claudia; Schurman, Leon; Mc Carthy, Antonio D.; Cortizo, Ana M. LV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata Noviembre de 2010. Revista medicina, Buenos Aires Volumen 70 Suplemento II- 2010.

10. “La metformina revierte las alteraciones del metabolismo óseo asociadas al síndrome metabólico inducido por fructosa en ratas”. Felice J, Cortizo A, Molinuelo M Gangoiti M, Tolosa M, Sedlinsky C, Schurman L, McCarthy A. Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata Noviembre de 2010. Revista medicina, Buenos Aires Volumen 70 Suplemento II- 2010.

11. “La diabetes altera el potencial osteogénico de células progenitoras de médula ósea. Efectos del tratamiento con metformina”. Tolosa MJ, Chugranksy S, Shurman L, Sedlinsky C, Cortizo AM, McCarthy AD, Molinuevo SM. XVII Congreso de la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo. Buenos Aires. Noviembre 2011.

12. “Efecto de la Diabetes tipo 2 y el tratamiento con metformina sobre el potencial osteogénico de células progenitoras de médula ósea de rata”. Tolosa MJ, Chugranksy S, Sedlinsky C, Shurman L, Cortizo AM, McCarthy AD, Molinuevo SM. Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata Noviembre de 2011.

13. “Efectos de la diabetes y la metformina sobre la microarquitectura de huesos largos en la rata”. Tolosa MJ; Molinuevo MS; Sedlinsky C; Schurman L; McCarthy AD; Cortizo AM. X Congreso Argentino de Osteoporosis, IX Congreso de Enfermedades del Metabolismo Óseo y Mineral del MERCOSUR. Agosto de 2012. Buenos Aires Argentina.

14. Efectos de la Diabetes mellitus en osteogénesis: mecanismos mediados por AGEs y Alendronato”. Chuguranksy SR, Tolosa MJ, McCarthy AD, Cortizo AM”. Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata Noviembre de 2012.